

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-325091
(P2000-325091A)

(43) 公開日 平成12年11月28日 (2000. 11. 28)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テーマコード* (参考) |
|---------------------------|-------|----------------|--------------|
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| A 0 1 K 67/027 | | A 0 1 K 67/027 | |
| C 0 7 K 14/47 | | C 0 7 K 14/47 | |
| C 1 2 N 1/15 | | C 1 2 N 1/15 | |
| 1/19 | | 1/19 | |

審査請求 未請求 請求項の数87 O L (全 59 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|--------------|----------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2000-81795 (P2000-81795) | (71) 出願人 | 000004569 日本たばこ産業株式会社 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 |
| (22) 出願日 | 平成12年3月17日 (2000. 3. 17) | (72) 発明者 | 秋山 清隆 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-2 日 本たばこ産業株式会社医薬探索研究所内 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願平11-71390 | (72) 発明者 | 笹井 平 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-2 日 本たばこ産業株式会社医薬探索研究所内 |
| (32) 優先日 | 平成11年3月17日 (1999. 3. 17) | (72) 発明者 | 渡部 博貴 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-2 日 本たばこ産業株式会社医薬探索研究所内 |
| (33) 優先権主張国 | 日本 (J P) | (74) 代理人 | 100102978 弁理士 清水 初志 (外1名) |

(54) 【発明の名称】 相同組換え用ジーンターゲットングDNAの製造方法及びcDNAライブラリーのスクリーニン

(57) 【要約】 グ方法

【課題】 医薬品の研究開発に有用なノックアウト動物やノックイン動物の製造に必須である相同組換え用ターゲットングDNA (ベクター) の製造に要する労力、期間及びコストを飛躍的に低減することができ、またESTのような短いDNA配列のジーンターゲットングにも適用可能な新規な製造方法、並びに該ターゲットングDNAによりジーンターゲットングされた細胞、細菌またはウイルスを正確に選別することができる新規な方法を提供する。

【解決手段】 標的DNA配列を含むゲノムDNA断片を分子内連結 (自己環状化) させた環状ゲノムDNAをを鋳型とし、該標的DNA配列を基に設計した一対のプライマーDNAを用いた逆PCR反応 (inverse PCR ; inside-out PCR) を利用することにより、従来ターゲットングDNAの製造に必要であったブランクハイブリダイゼーションや制限酵素地図の作成を必要とせず、製造期間を約1/10以下に短縮可能な新規製造方法を見出した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生物の内在性ゲノムDNA中のDNA配列の一部を、相同組換えにより修飾するためのターゲティングDNAの製造方法であって、下記工程（a）乃至（e）の工程：

（a）該生物のゲノムDNA断片であって該DNA配列[T]を含むゲノムDNA断片を含むDNA[CL]を、制限酵素[E1]により、該DNA配列[T]の外側に各々存在する制限酵素[E1]により切断可能な制限酵素認識DNA配列[X]で切断し、該制限酵素[E1]による切断末端DNA配列を両端に有し且つ該DNA配列[T]を含むゲノムDNA断片[L1]を調製する工程；

（b）該ゲノムDNA断片[L1]を該切断末端DNA配列で分子内連結させることにより、制限酵素認識DNA配列[X]及び該DNA配列[T]を含む環状ゲノムDNA[C1]を調製する工程；

（c）該環状ゲノムDNA[C1]の各々のDNA鎖を鋳型とし、下記プライマーDNA[P1]及びプライマーDNA[P2]：プライマーDNA[P1]：5'末端近傍に制限酵素[E2]により切断可能な制限酵素認識DNA配列を有し、且つその下流に該環状ゲノムDNA[C1]の一方のDNA鎖[I]中のDNA配列[T]の5'末端側のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[I]中のDNA配列[T]の5'末端側にアニーリングし得るように設計されたプライマーDNA；及び

プライマーDNA[P2]：5'末端近傍に制限酵素[E3]により切断可能な制限酵素認識DNA配列を有し、且つその下流に該環状ゲノムDNA[C1]の他方のDNA鎖[II]中のDNA配列[T]の5'末端側のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[II]中のDNA配列[T]の5'末端側にアニーリングし得るように設計されたプライマーDNA、を用いた逆ポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅により、下記のDNA鎖[III]及びDNA鎖[IV]：

DNA鎖[III]：該プライマーDNA[P1]に相補的なDNA配列及び該プライマーDNA[P2]と同一のDNA配列の各々を末端に有し、且つ制限酵素認識DNA配列[X]を含むDNA鎖；及び

DNA鎖[IV]：該プライマーDNA[P1]と同一のDNA配列及び該プライマーDNA[P2]に相補的なDNA配列の各々を末端に有し、且つ制限酵素認識DNA配列[X]を含むDNA鎖、とからなる組換えゲノムDNA断片[L2]を調製する工程；

（d）該組換えゲノムDNA断片[L2]の末端を制限酵素[E2]及び制限酵素[E3]で消化して組換えゲノムDNA断片[L2']を得、該組換えゲノムDNA断片[L2']を、制限酵素[E2]による切断末端DNA配列及び制限酵素[E3]による切断末端DNA配列を各々の末端に有し、且つ該生物

にとって外来である外来性DNAを該外来性DNAが細胞中で発現できるような配置で含む線状化発現ベクターDNAと連結させることにより環状ゲノムDNA[C2]を調製する工程；及び

（e）該環状ゲノムDNA[C2]を制限酵素[E1]により制限酵素認識DNA配列[X]で切断して得られる組換えゲノムDNA断片[L3]をターゲティングDNAとして回収する工程、を含むことを特徴とするターゲティングDNAの製造方法。

【請求項2】 該外来性DNAが、マーカー遺伝子からなるDNAであることを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】 該外来性DNAが、マーカー遺伝子及びレポーター遺伝子からなるDNAであることを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

【請求項4】 該レポーター遺伝子が、ルシフェラーゼまたはβラクタマーゼをコードする遺伝子であることを特徴とする請求項3に記載の製造方法。

【請求項5】 該マーカー遺伝子が、ネオマイシン耐性遺伝子であることを特徴とする請求項2乃至請求項4のいずれかに記載の製造方法。

【請求項6】 該制限酵素[E2]と制限酵素[E3]が同一の制限酵素であることを特徴とする請求項1乃至請求項5のいずれかに記載の製造方法。

【請求項7】 該制限酵素[E2]と制限酵素[E3]が各々異なる制限酵素であることを特徴とする請求項1乃至請求項5のいずれかに記載の製造方法。

【請求項8】 該生物が、脊椎動物、昆虫、原生動物、植物、細菌またはウイルスであることを特徴とする請求項1乃至請求項7のいずれかに記載の製造方法。

【請求項9】 該脊椎動物が、非ヒト哺乳動物であることを特徴とする請求項8に記載の製造方法。

【請求項10】 該非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする請求項9に記載の製造方法。

【請求項11】 該DNA[CL]が、マウスのゲノムDNA断片をバクテリア人工染色体（BAC）または酵母人工染色体（YAC）中にクローン化してなるマウスゲノムDNA断片のライブラリーから選別されるものであることを特徴とする請求項10に記載の製造方法。

【請求項12】 該修飾が、該DNA配列[T]のmRNAへの転写を不能たらしめ、且つ該外来性DNAの発現を可能たらしめるものであることを特徴とする請求項1乃至請求項11のいずれかに記載の製造方法。

【請求項13】 生物の内在性ゲノムDNA中のDNA配列の一部を、相同組換えにより修飾するためのターゲティングDNAの製造方法であって、下記工程（a）乃至（f）の工程：

（a）該生物のゲノムDNA断片であって該DNA配列[T]を含むゲノムDNA断片を含むDNA[CL]を、制限酵素[E1]により、該DNA配列[T]の外側に各々存在する制

制限酵素[E1]により切断可能な制限酵素認識DNA配列[X]で切断し、該制限酵素[E1]による切断末端DNA配列を両端に有し且つ該DNA配列[T]を含むゲノムDNA断片[L1]を調製する工程；

(b) 該ゲノムDNA断片[L1]を該切断末端DNA配列で分子内連結させることにより、制限酵素認識DNA配列[X]及び該DNA配列[T]を含む環状ゲノムDNA[C1]を調製する工程；

(c) 該環状ゲノムDNA[C1]の各々のDNA鎖を鋳型とし、下記プライマーDNA[P1]及びプライマーDNA[P2]：プライマーDNA[P1]：5'末端近傍に制限酵素[E2]により切断可能な制限酵素認識DNA配列を有し、且つその下流に該環状ゲノムDNA[C1]の一方のDNA鎖[I]中のDNA配列[T]の5'末端側のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[I]中のDNA配列[T]の5'末端側にアニーリングし得るように設計されたプライマーDNA；及び

プライマーDNA[P2]：5'末端近傍に制限酵素[E3]により切断可能な制限酵素認識DNA配列を有し、且つその下流に該環状ゲノムDNA[C1]の他方のDNA鎖[II]中のDNA配列[T]の5'末端側のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[II]中のDNA配列[T]の5'末端側にアニーリングし得るように設計されたプライマーDNA、を用いた逆ポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅により、下記のDNA鎖[III]及びDNA鎖[IV]：

DNA鎖[III]：該プライマーDNA[P1]に相補的なDNA配列及び該プライマーDNA[P2]と同一のDNA配列の各々を末端に有し、且つ制限酵素認識DNA配列[X]を含むDNA鎖；及び

DNA鎖[IV]：該プライマーDNA[P1]と同一のDNA配列及び該プライマーDNA[P2]に相補的なDNA配列の各々を末端に有し、且つ制限酵素認識DNA配列[X]を含むDNA鎖、とからなる組換えゲノムDNA断片[L2]を調製する工程；

(d) 該組換えゲノムDNA断片[L2]の末端を制限酵素[E2]及び制限酵素[E3]で消化して組換えゲノムDNA断片[L2']を得、該組換えゲノムDNA断片[L2']を、制限酵素[E2]による切断末端DNA配列及び制限酵素[E3]による切断末端DNA配列を各々の末端に有し、且つ該生物にとって外来である外来性DNAを該外来性DNAが細胞中で発現できるような配置で含む線状化発現ベクターDNAと連結させることにより環状ゲノムDNA[C2]を調製する工程；及び

(e) 該環状ゲノムDNA[C2]を、制限酵素[E1]により切断し、該制限酵素切断部位に制限酵素[E4]により切断可能な制限酵素認識DNA配列[Y]を含むリンカーDNAを挿入することにより、該制限酵素認識DNA配列[Y]

及び該標的DNA配列[T]を含む組換え環状ゲノムDNA[C3]を調製する工程；

(f) 該環状ゲノムDNA[C3]を制限酵素[E4]により制限酵素認識DNA配列[Y]で切断して得られる組換えゲノムDNA断片[L3]をターゲティングDNAとして回収する工程、を含むことを特徴とするターゲティングDNAの製造方法。

【請求項14】 該外来性DNAが、マーカー遺伝子からなるDNAであることを特徴とする請求項13に記載の製造方法。

【請求項15】 該外来性DNAが、マーカー遺伝子及びレポーター遺伝子からなるDNAであることを特徴とする請求項13に記載の製造方法。

【請求項16】 該レポーター遺伝子が、ルシフェラーゼまたはβラクタマーゼをコードする遺伝子であることを特徴とする請求項15に記載の製造方法。

【請求項17】 該マーカー遺伝子が、ネオマイシン耐性遺伝子であることを特徴とする請求項14乃至請求項16のいずれかに記載の製造方法。

【請求項18】 該制限酵素[E2]と制限酵素[E3]が同一の制限酵素であることを特徴とする請求項13乃至請求項17のいずれかに記載の製造方法。

【請求項19】 該制限酵素[E2]と制限酵素[E3]が各々異なる制限酵素であることを特徴とする請求項13乃至請求項17のいずれかに記載の製造方法。

【請求項20】 該生物が、脊椎動物、昆虫、原生動物、植物、細菌またはウイルスであることを特徴とする請求項13乃至請求項19のいずれかに記載の製造方法。

【請求項21】 該脊椎動物が、非ヒト哺乳動物であることを特徴とする請求項20に記載の製造方法。

【請求項22】 該非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする請求項21に記載の製造方法。

【請求項23】 該DNA[CL]が、マウスのゲノムDNA断片をバクテリア人工染色体(BAC)または酵母人工染色体(YAC)中にクローン化してなるマウスゲノムDNA断片のライブラリーから選別されるものであることを特徴とする請求項22に記載の製造方法。

【請求項24】 該修飾が、該DNA配列[T]のmRNAへの転写を不能たらしめ、且つ該外来性DNAの発現を可能たらしめるものであることを特徴とする請求項13乃至請求項23のいずれかに記載の製造方法。

【請求項25】 生物の内在性ゲノムDNA中のDNA配列の一部を、相同組換えにより修飾するためのターゲティングDNAの製造方法であって、下記工程(a)乃至

(e)の工程：

(a) 該生物のゲノムDNA断片であって該DNA配列[T]を含むゲノムDNA断片を含むDNA[CL]を、制限酵素[E1]により、該DNA配列[T]の外側に各々存在する制限酵素[E1]により切断可能な制限酵素認識DNA配列

[X]で切断し、該制限酵素[E1]による切断末端DNA配列を両端に有し且つ該DNA配列[T]を含むゲノムDNA断片[L1]を調製する工程；

(b) 該ゲノムDNA断片[L1]と、制限酵素[E4]により切断可能な制限酵素認識DNA配列[Y]を含むリンカーDNAとを連結させることにより、制限酵素認識DNA配列[Y]及び該DNA配列[T]を含む環状ゲノムDNA[C1]を調製する工程；

(c) 該組換え環状ゲノムDNA[C1]の各々のDNA鎖を鋳型とし、下記プライマーDNA[P1]及びプライマーDNA[P2]：

プライマーDNA[P1]：5'末端近傍に制限酵素[E2]により切断可能な制限酵素認識DNA配列を有し、且つその下流に該環状ゲノムDNA[C1]の一方のDNA鎖[I]中のDNA配列[T]の5'末端側のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[I]中のDNA配列[T]の5'末端側にアニーリングし得るように設計されたプライマーDNA；及び

プライマーDNA[P2]：5'末端近傍に制限酵素[E3]により切断可能な制限酵素認識DNA配列を有し、且つその下流に該環状ゲノムDNA[C1]の他方のDNA鎖[II]中のDNA配列[T]の5'末端側のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[II]中のDNA配列[T]の5'末端側にアニーリングし得るように設計されたプライマーDNA、を用いた逆ポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅により、下記のDNA鎖[III]及びDNA鎖[IV]：

DNA鎖[III]：該プライマーDNA[P1]に相補的なDNA配列及び該プライマーDNA[P2]と同一のDNA配列の各々を末端に有し、且つ制限酵素認識DNA配列[Y]を含むDNA鎖；及び

DNA鎖[IV]：該プライマーDNA[P1]と同一のDNA配列及び該プライマーDNA[P2]に相補的なDNA配列の各々を末端に有し、且つ制限酵素認識DNA配列[Y]を含むDNA鎖、とからなる組換えゲノムDNA断片[L2]を調製する工程；

(d) 該組換えゲノムDNA断片[L2]の末端を制限酵素[E2]及び制限酵素[E3]で消化して組換えゲノムDNA断片[L2']を得、該組換えゲノムDNA断片[L2']を、制限酵素[E2]による切断末端DNA配列及び制限酵素[E3]による切断末端DNA配列を各々の末端に有し、且つ該生物にとって外来である外来性DNAを該外来性DNAが細胞中で発現できるような配置で含む線状化発現ベクターDNAと連結させることにより環状ゲノムDNA[C2]を調製する工程；及び

(e) 該環状ゲノムDNA[C2]を制限酵素[E4]により制限酵素認識DNA配列[Y]で切断して得られる組換えゲノムDNA断片[L3]をターゲティングDNAとして回収

する工程、を含むことを特徴とするターゲティングDNAの製造方法。

【請求項26】 該外来性DNAが、マーカー遺伝子からなるDNAであることを特徴とする請求項25に記載の製造方法。

【請求項27】 該外来性DNAが、マーカー遺伝子及びレポーター遺伝子からなるDNAであることを特徴とする請求項25に記載の製造方法。

【請求項28】 該レポーター遺伝子が、ルシフェラーゼまたはβラクタマーゼをコードする遺伝子であることを特徴とする請求項27に記載の製造方法。

【請求項29】 該マーカー遺伝子が、ネオマイシン耐性遺伝子であることを特徴とする請求項25乃至請求項28のいずれかに記載の製造方法。

【請求項30】 該制限酵素[E2]と制限酵素[E3]が同一の制限酵素であることを特徴とする請求項25乃至請求項29のいずれかに記載の製造方法。

【請求項31】 該制限酵素[E2]と制限酵素[E3]が各々異なる制限酵素であることを特徴とする請求項25乃至請求項29のいずれかに記載の製造方法。

【請求項32】 該生物が、脊椎動物、昆虫、原生動物、植物、細菌またはウイルスであることを特徴とする請求項25乃至請求項31のいずれかに記載の製造方法。

【請求項33】 該脊椎動物が、非ヒト哺乳動物であることを特徴とする請求項32に記載の製造方法。

【請求項34】 該非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする請求項33に記載の製造方法。

【請求項35】 該DNA[CL]が、マウスのゲノムDNA断片をバクテリア人工染色体(BAC)または酵母人工染色体(YAC)中にクローン化してなるマウスゲノムDNA断片のBACライブラリーから選別されるものであることを特徴とする請求項34に記載の製造方法。

【請求項36】 該修飾が、該DNA配列[T]のmRNAへの転写を不能たらしめ、且つ該外来性DNAの発現を可能たらしめるものであることを特徴とする請求項25乃至請求項35のいずれかに記載の製造方法。

【請求項37】 生物の内在性ゲノムDNA中のDNA配列の一部を、相同組換えにより修飾するためのターゲティングDNAの製造方法であって、下記工程(a)乃至(c)の工程：

(a) 該生物のゲノムDNA断片であって該DNA配列[T]を含むゲノムDNA断片[L1]と制限酵素[E1]で切断可能な制限酵素認識DNA配列[X]を有する発現ベクターDNAとからなる環状ゲノムDNA[C1]の各々のDNA鎖を鋳型とし、下記プライマーDNA[P1]及びプライマーDNA[P2]：

プライマーDNA[P1]：5'末端近傍に制限酵素[E2]により切断可能な制限酵素認識DNA配列を有し、且つその下流に該環状ゲノムDNA[C1]の一方のDNA鎖[I]中

のDNA配列[T]の5'末端側のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[I]中のDNA配列[T]の5'末端側にアニーリングするように設計されたプライマーDNA；及び

プライマーDNA[P2]：5'末端近傍に制限酵素[E3]により切断可能な制限酵素認識DNA配列を有し、且つその下流に該環状ゲノムDNA[C1]の他方のDNA鎖[II]中のDNA配列[T]の5'末端側のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[II]中のDNA配列[T]の5'末端側にアニーリングするように設計されたプライマーDNA、を用いた逆ポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅により、下記DNA鎖[III]及びDNA鎖[IV]：

DNA鎖[III]：該プライマー[P1]に相補的なDNA配列及び該プライマーDNA[P2]と同一のDNA配列を各々の末端に有し、且つ制限酵素認識DNA配列[X]を含むDNA鎖；及び

DNA鎖[IV]：該プライマー[P1]と同一のDNA配列及び該プライマーDNA[P2]に相補的なDNA配列を各々の末端に有し、且つ制限酵素認識DNA配列[X]を含むDNA鎖、とからなる組換えゲノムDNA断片[L2]を調製する工程；

(b) 該組換えゲノムDNA断片[L2]の末端を制限酵素[E2]及び制限酵素[E3]で消化して組換えゲノムDNA断片[L2']を得、該組換えゲノムDNA断片[L2']を、制限酵素[E2]による切断末端DNA配列及び制限酵素[E3]による切断末端DNA配列を各々の末端に有する該生物にとって外来である外来性DNAと連結させることにより環状ゲノムDNA[C3]を調製する工程；及び

(c) 該環状ゲノムDNA[C2]を制限酵素[E1]により制限酵素認識DNA配列[X]で切断して得られる組換えゲノムDNA断片[L3]をターゲットングDNAとして回収する工程、を含むことを特徴とするターゲットングDNAの製造方法。

【請求項38】 下記工程(a2)乃至(a4)：

(a2) 工程(a)で得た組換えゲノムDNA断片[L2]を分子内連結することにより環状ゲノムDNA[C2]を調製する工程；

(a3) 宿主を該環状ゲノムDNA[C2]で形質転換することにより得られる形質転換宿主を培養することにより該環状ゲノムDNA[C2]を増幅する工程；及び

(a4) 該環状ゲノムDNA[C2]を制限酵素[E2]及び／または制限酵素[E3]により該分子内連結部位で切断して、所望の量の該組換えゲノムDNA断片[L2]を調製する工程、をさらに含むことを特徴とする請求項37に記載の製造方法。

【請求項39】 該外来性DNAが、マーカー遺伝子からなるDNAであることを特徴とする請求項37または

請求項38に記載の製造方法。

【請求項40】 該外来性DNAが、マーカー遺伝子及びレポーター遺伝子からなるDNAであることを特徴とする請求項37または請求項38に記載の製造方法。

【請求項41】 該レポーター遺伝子が、ルシフェラーゼまたはβラクタマーゼをコードする遺伝子であることを特徴とする請求項40に記載の製造方法。

【請求項42】 該制限酵素[E2]と制限酵素[E3]が同一の酵素であることを特徴とする請求項37乃至請求項41のいずれかに記載の製造方法。

【請求項43】 該制限酵素[E2]と制限酵素[E3]が各々異なる酵素であることを特徴とする請求項37乃至請求項41のいずれかに記載の製造方法。

【請求項44】 該生物が、脊椎動物、昆虫、原生動物、植物、細菌またはウイルスであることを特徴とする請求項37乃至請求項43のいずれかに記載の製造方法。

【請求項45】 該脊椎動物が、非ヒト哺乳動物であることを特徴とする請求項44に記載の製造方法。

【請求項46】 該非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする請求項45に記載の製造方法。

【請求項47】 該ゲノムDNA断片[L1]が、マウスのゲノムDNA断片をバクテリア人工染色体(BAC)または酵母人工染色体(YAC)中にクローン化してなるマウスゲノムDNA断片のライブラリーから選別されたクローン中に含まれるマウスゲノムDNA断片に由来するものであることを特徴とする請求項46に記載の製造方法。

【請求項48】 該環状ゲノムDNA[C1]が、該生物のゲノムDNAを制限酵素で消化して得られる任意のゲノムDNA断片の各々と制限酵素[E1]で切断可能な制限酵素認識DNA配列[X]を有する発現ベクターDNAとからなる複数種類の環状ゲノムDNAからなるゲノムDNAライブラリー中に含まれていることを特徴とする請求項37乃至請求項47のいずれかに記載の製造方法。

【請求項49】 該ゲノムDNAライブラリーが、該環状ゲノムDNAを複数のウェルを有するマイクロプレートに配備してなるゲノムDNAライブラリーであることを特徴とする請求項48に記載の製造方法。

【請求項50】 該環状ゲノムDNA中に含まれる該ゲノムDNA断片の大きさが、約5乃至約12Kbであることを特徴とする請求項48または請求項49に記載の製造方法。

【請求項51】 約5乃至約12Kbの大きさの生物のゲノムDNA断片を発現ベクターにクローン化してなる複数種類のクローンからなるゲノムDNA断片ライブラリー。

【請求項52】 該ゲノムDNAライブラリーが、該クローンの各々を多数のウェルを有するマイクロプレートに配備してなることを特徴とする請求項51に記載のゲ

ノムDNAライブラリー。

【請求項53】 請求項1乃至請求項50のいずれかに記載の製造方法により得られるターゲティングDNA。

【請求項54】 内在性ゲノムDNA中の一部のDNA配列が修飾された組換え細胞、組換え細菌または組換えウイルスの製造方法であって、生物の細胞、細菌またはウイルスを請求項1乃至請求項12または請求項37乃至請求項50のいずれかに記載の製造方法により製造されるターゲティングベクターDNAで形質転換し、該ターゲティングDNAと該内在性ゲノムDNAとの間の相同組換えの結果、該内在性ゲノムDNAに該ターゲティングベクターDNAが組込まれている細胞、細菌またはウイルスを選別し、取得することからなる製造方法。

【請求項55】 内在性ゲノムDNA中の一部のDNA配列が修飾された組換え細胞、組換え細菌または組換えウイルスの製造方法であって、生物の細胞、細菌またはウイルスを請求項13乃至請求項36のいずれかに記載の製造方法により製造されるターゲティングベクターDNAで形質転換し、該ターゲティングDNAと該内在性ゲノムDNAとの間の相同組換えの結果、該内在性ゲノムDNAに該ターゲティングベクターDNAが組込まれている細胞、細菌またはウイルスを選別し、取得することからなる製造方法。

【請求項56】 該細胞、細菌またはウイルスの選別が、下記の工程：

a) 該細胞、細菌またはウイルスの内在性ゲノムDNAの各々のDNA鎖を鋳型とし、下記のプライマーDNA[P3]及びプライマーDNA[P4]：

プライマーDNA[P3]：該ターゲティングベクターDNAの一方のDNA鎖の3'末端側の該リンカーDNA由来のDNA配列及びそれに隣接する制限酵素[E4]による切断末端DNA配列の一部に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA；及び、

プライマーDNA[P4]：該ターゲティングベクターDNAの他方のDNA鎖に含まれる該外来性DNAの一部のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA、を用いたポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅を行う工程；及び

b) ゲル電気泳動によりDNAの増幅が認められない細胞、細菌またはウイルスを同定し、回収する工程、を含むことを特徴とする請求項55に記載の製造方法。

【請求項57】 該細胞、細菌またはウイルスの選別が、下記の工程：

a) 該細胞、細菌またはウイルスの内在性ゲノムDNAの各々のDNA鎖を鋳型とし、下記のプライマーDNA[P3]及びプライマーDNA[P4]：プライマーDNA[P3]：該ターゲティングベクターDNAの一方のDNA鎖[1]の3'末端側の該リンカーDNA由来のDNA配列及びそれに隣接する制限酵素[E4]による切断末端DNA配列の一部に相補的なDNA配列を有するプライマーDN

A；及び、

プライマーDNA[P4]：該ターゲティングベクターDNAの他方のDNA鎖[11]に含まれる該外来性DNAの一部のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA、を用いたポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅を行う工程；

b) ゲル電気泳動によりDNAの増幅が認められない細胞、細菌またはウイルスを同定する工程；

c) 工程b)で同定された細胞、細菌またはウイルスの内在性ゲノムDNAの各々のDNA鎖を鋳型とし、下記のプライマーDNA[P5]及びプライマーDNA[P6]：

プライマーDNA[P5]：該ターゲティングベクターDNAの該DNA鎖[II]の3'末端側の該リンカーDNA由来のDNA配列及びそれに隣接する制限酵素[E4]による切断末端DNA配列の一部に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA；及び、

プライマーDNA[P6]：該ターゲティングベクターDNAの該DNA鎖[I]に含まれる該外来性DNAの一部のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA、を用いたポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅を行う工程；及び

d) ゲル電気泳動によりDNAの増幅が認められない細胞、細菌またはウイルスを同定し、回収する工程、を含むことを特徴とする請求項55に記載の製造方法。

【請求項58】 該細胞、細菌またはウイルスの選別が、下記の工程：

a) 該細胞、細菌またはウイルスの内在性ゲノムDNAの各々のDNA鎖を鋳型とし、下記のプライマーDNA[P3]及びプライマーDNA[P4]：

プライマーDNA[P3]：該ターゲティングベクターDNAの一方のDNA鎖[1]の3'末端側の該リンカーDNA由来のDNA配列及びそれに隣接する制限酵素[E4]による切断末端DNA配列の一部に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA；及び、

プライマーDNA[P4]：該ターゲティングベクターDNAの他方のDNA鎖[11]に含まれる該外来性DNAの一部のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA、を用いたポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅を行う工程；

b) ゲル電気泳動によりDNAの増幅が認められない細胞、細菌またはウイルスを同定する工程；

c) 工程b)で同定された細胞、細菌またはウイルスの内在性ゲノムDNAの各々のDNA鎖を鋳型とし、下記のプライマーDNA[P5]及びプライマーDNA[P6]：

プライマーDNA[P5]：該ターゲティングベクターDNAの該DNA鎖[II]の3'末端側の該リンカーDNA由来のDNA配列及びそれに隣接する制限酵素[E4]による切断末端DNA配列の一部に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA；及び、

プライマーDNA[P6]：該ターゲティングベクターDN

Aの該DNA鎖[I]に含まれる該外来性DNAの一部のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA、を用いたポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅を行う工程；

d) ゲル電気泳動によりDNAの増幅が認められない細胞、細菌またはウイルスを同定する工程；

e) 該ターゲティングDNAの各々のDNA鎖を鋳型とし、該プライマーDNA[P3]及びプライマーDNA[P5]を用いたポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅を行う工程；

f) 増幅されたDNAの各々の末端側に存在する制限酵素認識DNA配列[X]に隣接する内側のDNA配列を決定する工程；

g) 工程d) で同定された細胞、細菌またはウイルスの内在性ゲノムDNAの各々のDNA鎖を鋳型とし、工程f) で決定されたDNA配列を基に下記のプライマーDNA[P7]及びプライマーDNA[P8]；

プライマーDNA[P7]：該ターゲティングベクターDNAの該DNA鎖[I]の3'末端側に存在する制限酵素認識DNA配列[X]及びそれに隣接する内側のDNA配列の一部に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA；及び、

プライマーDNA[P8]：該ターゲティングベクターDNAの該DNA鎖[II]の3'末端側に存在する制限酵素認識DNA配列[X]及びそれに隣接する内側のDNA配列の一部に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA、を用いたポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅を行う工程；及び、

h) ゲル電気泳動によりDNAの増幅が認められる細胞、細菌またはウイルスを同定し、回収する工程；を含むことを特徴とする請求項55に記載の製造方法。

【請求項59】 該生物の細胞が、脊椎動物、昆虫、原生動物、及び植物からなる群から選ばれるいずれかの生物の細胞であることを特徴とする請求項54乃至請求項58のいずれかに記載の製造方法。

【請求項60】 該脊椎動物が、非ヒト哺乳動物であることを特徴とする請求項59に記載の製造方法。

【請求項61】 該非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする請求項60に記載の方法。

【請求項62】 該ターゲティングベクターDNAが、請求項11、請求項23、請求項35または請求項47のいずれかに記載の製造方法により製造されるターゲティングベクターDNAであることを特徴とする請求項61に記載の製造方法。

【請求項63】 該細胞が、胚性幹細胞であることを特徴とする請求項60乃至請求項62のいずれかに記載の製造方法。

【請求項64】 該修飾が、該DNA配列のmRNAへの転写を不能たらしめ、且つ該外来性DNAの発現を可能たらしめるものであることを特徴とする請求項54乃至請

求項63のいずれかに記載の製造方法。

【請求項65】 請求項54乃至請求項64のいずれかに記載の製造方法により得られる組換え細胞、組換え細菌または組換えウイルス。

【請求項66】 請求項63に記載の製造方法により得られる組換え胚性幹細胞。

【請求項67】 内在性ゲノムDNA中の一部のDNA配列が修飾された組換え非ヒト哺乳動物の製造方法であって、下記(a)乃至(e)の工程；

(a) 雌性非ヒト哺乳動物[A]の受精卵に、請求項63に記載の製造方法により得られる組換え胚性幹細胞を注入し組換え受精卵を得る工程；

(b) 該組換え受精卵を、雌性非ヒト哺乳動物[B]の子宮に移植する工程；及び、

(c) 該雌性非ヒト哺乳動物[B]が出産する雄性または雌性の胎児[P]を得る工程、

(d) 下記(1)または(2)のいずれかの工程；

(1) 該胎児[P]が成長してなる雄性非ヒト哺乳動物[C]を雌性非ヒト哺乳動物[D]と交配させ該雌性非ヒト哺乳動物[D]が出産する雄性または雌性の胎児[Q]を得る工程；または、

(2) 該胎児[P]が成長してなる雌性非ヒト哺乳動物[C]を雄性非ヒト哺乳動物[D]と交配させ該雌性非ヒト哺乳動物[C]が出産する雄性または雌性の胎児[Q]を得る工程；

(e) 該胎児[Q]が成長してなる雄性または雌性の非ヒト哺乳動物[E]から、該組換え胚性幹細胞のゲノムDNA中の修飾に由来する修飾を、一对の染色体の一方に有する雄性または雌性の該非ヒト哺乳動物[E]を選別し、組換え非ヒト哺乳動物として得る工程、からなることを特徴とする製造方法。

【請求項68】 該雌性非ヒト哺乳動物[A]と該雌性非ヒト哺乳動物[B]とが同一の個体であることを特徴とする請求項67に記載の製造方法。

【請求項69】 該雌性非ヒト哺乳動物[A]と該雌性非ヒト哺乳動物[B]とが各々異なる個体であることを特徴とする請求項67に記載の製造方法。

【請求項70】 請求項67乃至請求項69のいずれかに記載の製造方法であって、さらに下記の工程(f)及び(g)；

(f) 下記(1)または(2)のいずれかの工程；

(1) 工程(e)で得られた雄性組換え非ヒト哺乳動物[E]を雌性非ヒト哺乳動物[F]と交配させ該雌性非ヒト哺乳動物[F]が出産する雄性または雌性の胎児[R]を得る工程；または、

(2) 工程(e)で得られた雌性組換え非ヒト哺乳動物[E]を雄性非ヒト哺乳動物[F]と交配させ該雌性非ヒト哺乳動物[E]が出産する雄性または雌性の胎児[R]を得る工程；及び、

(g) 該胎児[R]が成長してなる雄性または雌性の非ヒ

ト哺乳動物[G]から、該組換え胚性幹細胞のゲノムDNA中の修飾に由来する修飾を、一対の染色体の両方に有する雄性または雌性の該非ヒト哺乳動物[G]を選別し、組換え非ヒト哺乳動物として得る工程、からなることを特徴とする製造方法。

【請求項71】 該工程(d)が、雄性非ヒト哺乳動物[C]を雌性非ヒト哺乳動物[D]と交配させ該雌性非ヒト哺乳動物[C]が出産する雄性または雌性の胎児[Q]を得る工程からなることを特徴とする請求項67乃至請求項70のいずれかに記載の製造方法。

【請求項72】 該工程(f)が、雄性組換え非ヒト哺乳動物[E]を雌性非ヒト哺乳動物[F]と交配させ該雌性非ヒト哺乳動物[F]が出産する雄性または雌性の胎児[R]を得る工程からなることを特徴とする請求項70または請求項71に記載の製造方法。

【請求項73】 該修飾が、該DNA配列のmRNAへの転写を不能たらしめ、且つ該外来性DNAの発現を可能たらしめるものであることを特徴とする請求項67乃至請求項72のいずれかに記載の製造方法。

【請求項74】 該非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする請求項67乃至請求項73のいずれかに記載の製造方法。

【請求項75】 cDNAライブラリーに含まれる所望のcDNAを保持するクローンを同定し取得する方法であって、下記工程(a)乃至(c)：

(a) 該cDNAライブラリーの各々のクローンに対して、下記プライマーDNA[P1]及びプライマーDNA[P2]：

プライマーDNA[P1]：該所望のcDNAの一方のDNA鎖[I]の一部のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[I]の一部のDNA配列の5'末端側にアニーリングするように設計されたプライマーDNA；及び

プライマーDNA[P2]：該所望のcDNAの他方のDNA鎖[II]の一部のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[II]の一部のDNA配列の5'末端側にアニーリングするように設計されたプライマーDNA、を用いた逆ポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅を施す工程；

(b) ゲル電気泳動によりDNA増幅が認められるクローンを同定する工程；及び

(c) 該同定したクローンを取得する工程、からなる方法。

【請求項76】 該cDNAライブラリーが、各々のクローンを多数のウェルを有するマイクロプレートに配備してなるcDNAライブラリーであることを特徴とする請求項75に記載の方法。

【請求項77】 該所望のcDNAが、オープンリーデ

ィングフレーム(ORF)を含むことを特徴とする請求項75または請求項76に記載の方法。

【請求項78】 該所望のcDNAが、3'UTR、ORF及び5'UTRを含むことを特徴とする請求項75乃至請求項77のいずれかに記載の方法。

【請求項79】 該プライマー[P1]及びプライマー[P2]の各々が、下記のいずれか：

(a) 該所望のcDNAのORFにアニーリングする；

(b) 一方が該所望のcDNAのORFにアニーリングし、及び他方が該所望のcDNAの5'UTRにアニーリングする；

(c) 一方が該所望のcDNAのORFにアニーリングし、及び他方が該所望のcDNAの3'UTRにアニーリングする；または

(d) 一方が該所望のcDNAの5'UTRにアニーリングし、及び他方が該所望のcDNAの3'UTRにアニーリングする、の特徴を有するものであることを特徴とする請求項75乃至請求項78のいずれかに記載の方法。

【請求項80】 該cDNAライブラリーが、哺乳動物のmRNAに対応するcDNAのライブラリーであることを特徴とする請求項75乃至請求項79のいずれかに記載の方法。

【請求項81】 該哺乳動物が、マウス、ラットまたはヒトであることを特徴とする請求項80に記載の方法。

【請求項82】 配列番号25に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクをコードするDNAまたはその断片。

【請求項83】 配列番号24に記載される塩基配列を含むDNAまたはその断片。

【請求項84】 配列番号24に記載される塩基配列の塩基番号3乃至524の塩基を含むDNAまたはその断片。

【請求項85】 配列番号25に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクまたはその断片。

【請求項86】 請求項82乃至請求項84のいずれかに記載のDNA若しくはその断片を含む発現ベクター。

【請求項87】 請求項86に記載の発現ベクターで形質転換された形質転換細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、相同組換えによるゲノムDNAの修飾に用いられるターゲティングDNA(ベクター)の製造方法、組換え細胞の製造方法、組換え非ヒト哺乳動物の製造方法、該ターゲティングDNA(ベクター)の製造に用いられるゲノムDNAライブラリー、並びに該ターゲティングDNAに関する。さらに本発明は、cDNAライブラリーから所望のcDNAクローンをスクリーニングする方法に関する。

【0002】

【従来の技術】生物に生来備わっていない生物学的性状

を付与したり、生物が生来備えている生物学的性状の発現を抑制したり、さらには該生物のある遺伝子が担う機能を解析するための方法として、該生物の内在性ゲノムDNAの所望の部位（標的DNA配列）を人為的に修飾する遺伝子ターゲティング（ジーンターゲティング）が注目されている。この方法は、生物の生体において自然に起こり得る遺伝子相同組換えを、該生物の染色体上に存在する内在性ゲノムDNAと外来性ターゲティングDNA（ターゲティングベクター）との間で人為的に起こさせることにより、該内在性ゲノムDNA中の標的DNA配列中に該外来性ターゲティングDNA中に含まれる所望の外来性遺伝子を組込むことを基本原理とするものである。ターゲティングDNAの構造を適切に設計することにより、該標的DNA配列中の所望の部位に外来性遺伝子の挿入のみを行うこともできるし、また該標的DNA配列と外来性遺伝子との置換により該標的DNA配列を欠失させると同時に該外来性遺伝子を挿入することができる。

【0003】この方法により、内在性ゲノムDNAの一部が修飾（欠失、挿入または置換）を有し、該修飾の結果、（1）生来備わっていない生物学的性状を発現したり、あるいは逆に（2）生来備わっている生物学的性状を発現しないような組換え細胞や組換え生物（組換え非ヒト哺乳動物、組換え細菌、組換えウイルスなど）を作製することができる。前者（1）は、例えば、生物のある生理活性蛋白をコードする内在性遺伝子の近傍に該遺伝子の発現を増大させることができる調節遺伝子配列を挿入することにより該生理活性蛋白の分泌を増大させる遺伝子活性化（ジーンアクチベーション）と称される技術の実施において用いることができる。このジーンアクチベーションを施された組換え細胞は、養子免疫療法により種々疾患治療を治療するための細胞医薬として有望視されている（国際願願公開公報W091/06667など）。

【0004】一方、現在のところ、相同組換えによるジーンターゲティングは、後者（2）の目的、即ち、標的としてのある機能を有する蛋白あるいは機能が不明な蛋白をコードする内在性遺伝子の一部が相同組換えによりターゲティングDNA由来の外来性マーカー遺伝子（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子）で置換されることにより結果的に該マーカー遺伝子が該内在性遺伝子配列中に挿入され、該遺伝子のmRNAへの転写が阻害されることにより該蛋白の機能発現が阻害されている（即ち、標的遺伝子の不活性化、破壊）組換え細胞や組換え生物（例えば、組換え非ヒト哺乳動物、組換え細菌、組換えウイルスなど）の作製において汎用されている。このようにして作製された組換え細胞や組換え動物は、各々ノックアウト細胞及びノックアウト動物と称されている。

【0005】この相同組換えによるジーンターゲティングは、さらに、ノックイン細胞及びノックイン動物の製造においても汎用される有用な方法である。このノック

イン細胞及びノックイン動物は、前述のような相同組換えを、該マーカー遺伝子の上流にレポーター遺伝子（ルシフェラーゼ遺伝子やβラクタマーゼなど）などの所望の他の1つ以上の外来性遺伝子を発現可能のように配置されたターゲティングDNAを用いて行い、標的である内在性遺伝子の一部のDNA配列が該レポーター遺伝子とマーカー遺伝子とからなるDNAで置換されることにより製造され得、該内在性遺伝子のmRNAへの転写が阻害される（即ち、標的遺伝子の不活性化、破壊）一方で、該マーカー遺伝子に加えて該レポーター遺伝子などの所望の外来性遺伝子を発現することができる組換え細胞や組換え動物である。

【0006】ノックアウト細胞やノックアウト動物は、該標的内在性遺伝子が不活性化されることにより現れる細胞の形態学的変化、組織学的変化、個体の表現型上の変化、疾患症状の発現の有無、あるいは生存率等の種々の変化を、同一種の正常な細胞あるいは動物のそれを比較することにより、該不活性化された遺伝子がコードする蛋白の生理学的機能の解明を可能とする。

【0007】一方、ノックイン細胞やノックイン動物は、前述のノックアウト細胞やノックアウト動物において可能となる該不活性化内在性遺伝子の機能解析だけでなく、該標的内在性遺伝子の機能のさらに詳細な解析、並びに該標的内在性遺伝子の発現を調節する薬剤の同定を可能とするものである。即ち、ノックイン細胞やノックイン動物は、該不活性化された標的内在性遺伝子のかわりに挿入された外来性のルシフェラーゼやβラクタマーゼ等の外来性のレポーター遺伝子を発現するように作製されていることから、該標的内在性遺伝子の機能が不明である場合には、該ノックイン細胞やノックイン動物に医薬上の活性が判明している種々の薬剤や化合物を投与し、該薬剤の投与に依存する該レポーター遺伝子の発現の増減を測定することにより、該標的内在性遺伝子に関わる疾患を推定することが可能となる。また、該内在性遺伝子の機能並びに該遺伝子の疾患との関わりが明らかかな場合には、該ノックイン細胞やノックイン動物に種々の化合物を投与することにより、該化合物の投与に依存する該レポーター遺伝子の発現の増減を誘導する活性を有する化合物を同定することができる。そのようにして同定された化合物は該標的内在性遺伝子の発現調節剤として該遺伝子に関わる疾患の治療剤として開発される価値を有する。

【0008】相同組換えによるジーンターゲティングにおいて用いられるターゲティングDNA（ターゲティングベクター）は、内在性ゲノムDNA中の標的DNA配列の上流のゲノムDNA配列に相同なDNA配列、及び該標的DNA配列の下流のゲノムDNA配列に相同なDNA配列を各々の末端に有し、当該2つの相同なDNA配列の間にマーカー遺伝子などの外来性遺伝子を含む基本構造を有する。ターゲティングDNAと内在性ゲノム

DNAとの間で相同組換えを起こさせるためには、ターゲットDNAの2つの相同領域は各々少なくとも約2乃至5Kbの塩基長が必要とされる。従って、ターゲットDNAの製造のためには、標的内在性DNA配列を含むゲノムDNAをクローニングし、該2つの相同な長鎖ゲノムDNA配列を得る必要があり、相同組換え用ターゲットDNA（ベクター）の製造においては、この工程が最も時間と労力を必要とする工程である。

【0009】例えば、ノックアウトマウスあるいはノックインマウスの作製を例に挙げるならば、該マウスの作製に必要なターゲットDNA（ベクター）、即ち、マウスの内在性ゲノムDNA中のあるDNA配列（標的DNA配列）をマーカー遺伝子で置換することにより不活性化（破壊）するための相同組換えターゲットDNAの製造は、これまでのところ概ね下記のような操作工程が必要とされ、またこの方法が最も汎用されている唯一の方法である。

【0010】（1）標的DNA配列の一部のDNA配列を基に該DNA配列を含むDNAにハイブリダイズする少なくとも約200bp以上の塩基長を有するプローブを作製し、該プローブを放射性標識し、ブランクハイブリダイゼーション用の標識プローブを調製する。

（2）該放射性標識プローブ及び市販または必要に応じて調製したマウスゲノムDNAのλファージライブラリーを用いてブランクハイブリダイゼーションを行い、該標的DNA配列を含む長鎖ゲノムDNAがクローニングされている陽性λファージブランクを同定、取得する

（Crunsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第72巻、第3961頁、1975年）。

（3）該陽性クローンを複数の適当な制限酵素の組み合わせで消化して得られるゲノムDNA断片を電気泳動に供して各々のゲノムDNA断片の遺伝子の大きさを解析する。

【0011】（4）下記工程（5）で調製する2つのゲノムDNA断片を調製するための必要な遺伝子情報を得るために、該解析結果を基に該長鎖ゲノムDNAの制限酵素地図を作成する。

（5）該標的DNA配列の上流及び下流に位置する各々少なくとも2乃至5Kbの遺伝子長を有するゲノムDNA断片が得られるように、該制限酵素地図を基に、該長鎖ゲノムDNAを適当な制限酵素で切断する。ここで得られた2つのゲノムDNA断片を、相同組換え用ターゲットDNAの両端に各々配置する相同DNA配列として用いる。

（6）ネオマイシン等のマーカー遺伝子が発現可能なように配置されている発現ベクター、あるいは該マーカー遺伝子並びにルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子が発現可能なように配置されている発現ベクターを、適当な制限酵素を用い消化し、線状化発現ベクターDNAを調製、取得する。

（7）前記（5）で調製した2つの相同ゲノムDNA配列の各々を、該線状化が発現ベクターDNAの各々の末端に連結し、目的のターゲットDNAを得る。

【0012】上記方法により目的のターゲットDNAを得るためには、種々の条件が全て整った条件下でヒト一人が一日約8時間作業を行ったとして、通常約3ヶ月の期間を必要とする。また、上述のような従来法の実施においては、下記のような作業上の制約を受けるだけでなく種々の煩雑な操作を必要とする。工程（1）においてブランクハイブリダイゼーション用のプローブを作製するためには、標的DNA配列の塩基配列が少なくとも約200bp以上決定されていることが必要である。昨今多数報告されているマウスEST（Expressed Sequence Tag）などは、塩基長が200bpに満たないものも多数あるため、そのような短い塩基長のマウスESTを標的DNA配列とする場合には、ターゲットDNAの作製は不可能である。工程（2）におけるブランクハイブリダイゼーションは、放射性物質を扱わねばならないことから、特殊な施設と取り扱い上の細心の注意を必要とし操作が非常に煩雑となる。さらに、当該ブランクハイブリダイゼーションにより再現性を以て陽性ブランクを同定するためには、通常少なくとも3回の同一操作が必要とされ時間と労力を要する。

【0013】工程（3）及び（4）においては、工程（3）で得られた種々の組み合わせの制限酵素で切断して得られるゲノムDNA断片の各々を電気泳動に供し各々の断片の塩基長を解析し、該解析結果を基に正確な制限酵素地図を作成する必要がある。この制限酵素地図作成の工程は、上記全行程の中で最も時間と労力を必要とする工程である。

【0014】ノックアウトマウスあるいはノックインマウスの作製のための次の操作は、そのような方法により作製されたターゲットDNAを用いて、ノックアウト胚性幹細胞（Embryonic stem cell；ES細胞）またはノックアウトES細胞を作製する工程である。該組換えES細胞は、これまでのところ概ね下記のようにして作製されている。

（8）正常マウスの受精卵から取得される胚性幹細胞（Embryonic stem cell；ES細胞）に、ターゲットベクターをマイクロインジェクションする（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, No. 12, pp. 7380-7384, 1980；米国特許第4,873,191号公報）。

（9）該細胞の内在性ゲノムDNAと該ターゲットDNAとの相同組換えの結果生じる該内在性ゲノムDNAに該ターゲットDNAが組込まれたES細胞を、該ターゲットDNA中に含まれるマーカー遺伝子のDNA配列を基に設計されたプライマーと、該ターゲットDNAのさらに外側に位置する該内在性ゲノムDNAの既知の塩基配列を基に設計されたプライマーとを用いたポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase chain react

ion ; PCR反応、(「遺伝子増幅PCR法・基礎と新しい展開」、共立出版株式会社発行、1992年など)) による遺伝子増幅により得られる遺伝子増幅産物の大きさを解析することにより選別し、目的のノックアウトES細胞またはノックインES細胞として回収する。

【0015】上記工程(9)のようなPCRによるES細胞の選別は、内在性ゲノムDNAに組込まれたターゲットDNAのさらに外側に位置する該内在性ゲノムの塩基配列が既知である場合にのみ可能であり、該配列が不明な場合には、煩雑な試験操作を必要とするサザンハイブリダイゼーション(Southern hybridization)法により解析する必要がある。上述したとおり、ノックアウト動物あるいはノックイン動物の作製のために必要なターゲットDNA並びにノックアウトES細胞あるいはノックインES細胞の作製は、煩雑な操作に加え、多大な時間と労力を必要とするものがあった。

【0016】一方、上述のような従来のターゲットDNAの作製のためのツールの1つとしてのゲノムDNAライブラリー(例えば、市販のマウスゲノムDNAライブラリー)と同様に、マウスやヒトのcDNAライブラリーも市販品の購入や所望に応じ常法に従って作製することにより入手可能である。cDNAライブラリーには種々のcDNAライブラリーが入手可能であるが、例えば、哺乳動物の蛋白質の全長をコードするオープンリーディングフレーム(open reading frame; ORF)あるいはORFに加え5' UTRや3' UTRを含むcDNAライブラリーが遺伝子解析、医学及び薬学の研究分野で汎用されている。

【0017】この全長cDNAライブラリーをハイブリダイゼーションプローブを用いるブランクハイブリダイゼーションや一对のプライマーを用いるPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)によりスクリーニングすることにより、所望の蛋白質の全長をコードするORFを含むcDNAを選別、取得することが可能である。即ち、昨今の多数報告されているESTのような既知または未知の所望の蛋白質をコードするORF、5' UTR及び/または3' UTRの一部の塩基配列を知り得ている場合には、該塩基配列を基にプローブまたはプライマーを設計することによりハイブリダイゼーション法やPCRにより該所望の蛋白質の全長(ORF)をコードするcDNAを入手することが可能である。さらに、該同定されたcDNAの塩基配列を決定することにより該既知または未知の所望の蛋白質の全長アミノ酸配列を知ることができる。

【0018】上述のcDNAライブラリーのスクリーニングは、その操作の簡便性の観点から一对のプライマーを用いるPCRによるスクリーニングが有用である。しかしながら、このPCRによるスクリーニングを商業的に業として営む外部サービスが存在する理由の一つでもあるように、その実験操作を研究者自身が行う場合には、後述するようにその操作の煩雑性と多大な時間を要するものである。即ち、該PCRによるスクリーニング

は下記のような3回のPCRを含む工程からなる。

【0019】(1) 各々のcDNAクローンを複数枚の96ウェルマイクロプレートの各ウェルに配備したcDNAライブラリーを作製する(市販品も使用可能。例えば、Sawady/Origene社のRapid Screen cDNAライブラリーパネルなど)。

(2) 所望の蛋白質をコードするORF、5' UTR及び/または3' UTRの一部の塩基配列を基に設計された一对のプライマーDNAであって、該一对のプライマーは鋳型cDNAにアニーリングしPCR反応により該一对のプライマーの各々に対して内向きに塩基配列を増幅する一对のプライマーを作製する。

(3) 該一对のプライマーを用いて、該複数枚のマイクロプレート各々の全てのウェル中のクローン(約50万クローン)に対してPCRを施した後、PCR産物をゲル電気泳動することにより遺伝子増幅の認められる陽性ウェル(約5000クローン)を同定する。

(4) 前記(3)で同定された陽性ウェルのクローンを配備したサブプレート各々の全ウェル中のクローン(約5000クローン)に対してPCRを施した後、PCR産物をゲル電気泳動することにより遺伝子増幅の認められる陽性ウェル(約50クローン)を同定する。

(5) 前記(4)で同定された陽性ウェルのクローンを配備したマイクロプレートの全てのクローン(約50クローン)に対してPCRを施した後、PCR産物をゲル電気泳動することにより遺伝子増幅の有無を確認する。

(6) 遺伝子増幅が確認されたクローンを目的のcDNAクローンをして取得する。

【0020】

【発明が解決しようとする課題】従って、(1)従来のターゲットDNAの製造方法が有していた上述のような種々の問題点を改善し、短期間に低労力で簡便に相同組換え用ターゲットDNA(ベクター)を作製でき、また内在性ゲノムDNAに所望の修飾を施した細胞の簡便な選別を可能とする新規な方法の開発が強く望まれていた。また、(2)cDNAライブラリーをさらに簡便に且つ迅速にスクリーニングして所望のcDNAを保持するクローンを同定、取得できる方法の開発が強く望まれていた。即ち、本発明は、(1)従来のターゲットDNAの製造方法が有していた全ての問題点を解決し、ノックアウト動物やノックイン動物の作製の効率を増大させる新規且つ有用な方法、(2)該方法により作製されるターゲットDNA、(3)cDNAライブラリーを極めて簡便に且つ迅速にスクリーニングして所望のcDNAを保持するクローンを同定、取得できる新規且つ有用な方法、及び(4)該ターゲットDNAの製造において極めて有用であり、且つ該ターゲットDNAの作製の効率を大幅に増大させる新規ゲノムDNAライブラリーを提供することを課題とする。

【0021】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行い、従来のターゲティングDNAの製造方法に比べ、低労力で極めて簡便に相同組換え用ターゲティングDNA（ベクター）を製造でき、且つ製造に要する期間を飛躍的に短縮することが可能な新規且つ有用な本発明の相同組換え用ターゲティングDNAの製造方法を見出すに至った。本発明のターゲティングDNAの製造方法の概略を、図9乃至図11並びに図15に模式的に示す。さらに、本発明の方法により製造されるターゲティングDNAと内在性ゲノムDNAとの相同組換えにより、該内在性ゲノムDNAの一部が修飾された組換え細胞（例えば、胚性幹細胞など）または組換え生物（例えば、組換え非ヒト哺乳動物、組換え細菌、組換えウイルスなど）を簡便に選別できる新規且つ有用な本発明の方法を見出すに至った。その選別方法の概略を図12乃至図14に模式的に示す。また、cDNAライブラリーを極めて簡便に且つ迅速にスクリーニングして所望のcDNAを保持するクローンを同定、取得できる新規且つ有用な本発明の方法を見出すに至った。その方法の概略を図16に模式的に示す。

【0022】本発明の相同組換え用ターゲティングDNAの製造方法の1つは、下記の工程を含むものである。

- ①内在性ゲノムDNAの標的DNA配列に相同組換えによる修飾を施そうとする宿主のゲノムDNA断片であって、該標的DNA配列を含むゲノムDNA断片を取得する。
- ②該ゲノムDNA断片を該標的DNA配列の外側の部位で所望の制限酵素により切断する。
- ③該切断したゲノムDNA断片を、分子内連結（自己環状化）による環状ゲノムDNAを調製する。さらに、所望に応じ、該連結部位に所望の制限酵素により切断可能な塩基配列を含むリンカーDNAを挿入した環状ゲノムDNAを調製する。
- ④逆PCR反応（inverse PCR；inside-out PCR）により、該環状ゲノムDNAを該標的DNA配列から互いに外向きに増幅し得る一対のプライマーDNAを調製する。
- ⑤該環状ゲノムDNAを鋳型とし、該一対のプライマーDNAを用いて逆PCR反応を行い、該各々のプライマーDNAと同一の塩基及び／またはそれらに相補的な塩基配列を各々の末端に有し、前記②で用いた制限酵素により認識される塩基配列または前記③のリンカーDNAに含まれる制限酵素認識塩基配列を内部に含む組換えゲノムDNA断片を調製する。
- ⑥該組換えゲノムDNA断片を、宿主生物の内在性ゲノムDNAに導入したい所望の外来性DNA（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子などのマーカー遺伝子、ルシフェラーゼあるいはβラクタマーゼなどのレポーター遺伝子、あるいはその両方の遺伝子など）が発現可能なように配置された発現ベクターDNAを所望の制限酵素で切断して得られる線状化発現ベクターDNA配列と連結

し、再び環状化する。さらに、前記工程③におけるリンカーDNA配列の挿入を本工程で行うことができる。即ち、所望に応じ、該連結部位に所望の制限酵素により切断可能な塩基配列を含むリンカーDNAを挿入した環状ゲノムDNAを調製する。得られた環状DNA構築物は、適当な宿主（例えば、大腸菌など）を該DNA構築物で形質転換することにより増幅することができる。

⑦該環状DNA構築物を、該前記②で用いた制限酵素により認識される塩基配列または前記③のリンカーDNAに含まれる制限酵素認識塩基配列で切断して得られる組換えゲノムDNA断片を目的のターゲティングDNA（ベクター）として回収する。該ターゲティングDNAは、該標的DNA配列の外側に位置する該内在性ゲノムのDNA配列に相同なDNA配列（相同領域）であって、該内在性ゲノムDNAとの相同組換えに必要な十分な長さの相同領域を両端に有し、且つ該外来性DNAを配列の内部に有する。

【0023】本発明の相同組換え用ターゲティングDNAの製造方法の他の1つは、下記の工程を含むものである。

- ①内在性ゲノムDNAの標的DNA配列に相同組換えによる修飾を施そうとする宿主のゲノムDNA断片であって、該標的DNA配列を含むゲノムDNA断片と、所望の制限酵素で切断可能な制限酵素認識塩基配列を有する発現ベクターDNAとからなる環状ゲノムDNAを取得する。
- ②逆PCR反応（inverse PCR；inside-out PCR）により、該環状ゲノムDNAを該標的DNA配列から互いに外向きに増幅し得る一対のプライマーDNAを調製する。さらに所望に応じ、該一対のプライマーDNAの各々は、その5'末端に所望の制限酵素認識塩基配列を有することができる。
- ③該環状ゲノムDNAを鋳型とし、該一対のプライマーDNAを用いて逆PCR反応を行い、該各々のプライマーDNAと同一の塩基及び／またはそれらに相補的な塩基配列を各々の末端に有し、該発現ベクターDNAを内部に含む組換えゲノムDNA断片を調製する。
- ④所望に応じ、前記③で得た組換えゲノムDNA断片を、各々の末端で分子内連結（自己環状化）することにより環状ゲノムDNAを調製し、この環状ゲノムDNAで形質転換した適当な宿主（例えば、大腸菌など）を培養することにより所望の量の該環状ゲノムDNAを調製する。
- ⑤前記③で得た組換えゲノムDNA断片または前記④で増幅した環状ゲノムDNAを、前記②におけるプライマーの5'末端に配備した制限酵素認識配列を認識する制限酵素で処理する。この処理により、前記③で得た組換えゲノムDNA断片の両末端が、制限酵素切断末端塩基配列を有することとなる。
- ⑥前記⑤で得た組換えゲノムDNA断片を、宿主生物の内在性ゲノムDNAに導入したい所望のマーカー遺伝子（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子など）及び／または

レポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼあるいはβラクタマーゼなど）を含む外来性DNA（好ましくは、該組換えゲノムDNA断片と同一の制限酵素切断末端DNA配列を有する）と連結することにより再び環状ゲノムDNAを調製する。

⑦前記⑥で得た環状ゲノムDNAを、この環状ゲノムDNAの塩基配列中に含まれる前記①の発現ベクターDNA中の任意に部位で、制限酵素により切断して得られる組換えゲノムDNA断片を目的のターゲティングDNA（ベクター）として回収する。該ターゲティングDNAは、該標的DNA配列の外側に位置する該内在性ゲノムのDNA配列に相同なDNA配列（相同領域）であって、該内在性ゲノムDNAとの相同組換えに必要な十分な長さの相同領域を両端に有し、且つ該外来性DNAを配列の内部に有する。

【0024】本発明のターゲティングDNA（ベクター）の製造方法は、前述した従来の方法において避けることができなかった下記（1）乃至（3）のような煩雑な操作を必要としないことから、本発明の方法を用いれば、従来法によるターゲティングDNAの製造に要していた約3ヶ月という製造期間を最短で約2週間に短縮することが可能である。：

（1）標的DNA配列を含む内在性ゲノムDNA断片の取得に、時間と労力を要するブランクハイブリダイゼーション法を行う必要がある。

（2）ブランクハイブリダイゼーションの実施には、放射性物質とRI（放射性同位体）管理施設等の特殊な試薬及び施設の使用を必要とする。

（3）多大な時間と労力を要する得られた内在性ゲノムDNA断片の制限酵素地図の作成が必須である。

【0025】また、従来の方法では、その煩雑な操作の必要性から複数種類のターゲティングDNAの製造を一人で同時に行うことが不可能であったが、本発明の方法を用いれば、その簡便性により、一人で複数種類のターゲティングDNAの製造を同時に行うことが可能である。従って、それら2つの効果が合わさることにより、本発明の製造方法を用いれば、一種類のターゲティングベクターの製造のための期間を、最短で約1週間に短縮できることとなる。また、この製造期間の飛躍的な短縮により、ターゲティングベクターの製造に要するコストを大幅に低減することが可能となる。

【0026】さらに、従来の方法においては、ブランクハイブリダイゼーション用のプローブを作製するために、標的DNA配列の塩基配列が少なくとも約200bp以上決定されていることが必要であったため、EST（Expressed Sequence Tag）のような塩基長が200bpに満たないDNA配列を標的とするターゲティングDNAの作製は不可能であった。一方、本発明の製造方法によるターゲティングDNAの製造においては、各々標的DNA配列の一部に相補的な2種類のPCR用プライマ

ーDNAを設計することが可能な最低約70bpの塩基配列が決定されていれば十分である。即ち、本発明の製造方法を用いれば、従来法では不可能であった、塩基長が200bpに満たないESTのような短いDNA配列を標的としたターゲティングDNAの製造が可能である。

【0027】本発明の他の一つは、上述の本発明のターゲティングDNAを用いた相同組換えにより製造される組換え細胞（例えば、組換えES細胞など）または組換え生物（例えば、組換え非ヒト哺乳動物、組換え細菌、組換えウイルス、組換え植物など）、即ち、該ターゲティングDNAと内在性ゲノムDNAとの相同組換えにより該内在性ゲノムDNA中の標的DNA配列が修飾された組換え細胞または組換え生物の選別方法である。本発明の選別方法は、下記の工程を含む方法である。

①前述のようにして製造されたターゲティングDNAのいずれかの末端から該ターゲティングDNAに含まれる外来性DNA（例えば、ネオマイシン等のマーカー遺伝子）の所望の領域までのDNA配列をPCRにより増幅することが可能な下記A及びBの一对のプライマーDNAを設計、調製する。

A）該外来性DNAの一部の塩基配列に相補的なプライマーDNA。

B）該ターゲティングDNAのいずれかの末端の塩基配列に相補的なプライマーDNA。

②被験組換え細胞または被験組換え生物の内在性ゲノムDNAを鋳型とし、前記2つのプライマーDNAを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によりDNA増幅を行う。

③ゲル電気泳動によりDNAの増幅が認められない組換え細胞または組換え生物を同定し、回収する。

【0028】従来のPCRを利用した相同組換えによる組換え細胞または組換え生物の選別は、該ターゲティングDNA中に含まれるマーカー遺伝子のDNA配列を基に設計されたプライマーと、該ターゲティングDNAのさらに外側に位置する該内在性ゲノムDNAの既知の塩基配列を基に設計されたプライマーとを用いたPCRに基づくものであった。しかしながら、この方法は、内在性ゲノムDNAに組込まれたターゲティングDNAのさらに外側に位置する該内在性ゲノムの塩基配列が既知である場合にのみ可能であり、該外側の配列が不明な場合には、煩雑な試験操作を必要とするサザンハイブリダイゼーション（Southern hybridization）法による解析をせざるを得なかった。

【0029】一方、ターゲティングDNAと内在性ゲノムDNAとの相同組換えにおいては、これまでの実験による分析から次のような事実が明らかとなっている。即ち、ターゲティングDNAが正しい相同組換えにより標的DNA配列中に組み込まれた場合には、該ターゲティングDNAは末端配列を欠落することなく組み込まれている。しかしながら、ランダムインテグレーション（ra

ndom integration) のように、ターゲティングDNA が、標的DNA配列以外の部位あるいは誤った形で内在性ゲノムDNAに組み込まれた場合には、組み込まれたターゲティングDNAは、かなり高い確率でその末端配列を欠落している。

【0030】本発明者らは、この実験的事実に着目して、組換え細胞（または組換え生物）の内在性ゲノムDNA中に組み込まれたターゲティングDNAの末端配列の有無を上述したPCRにより解析することにより極めて高い精度で正常な相同組換えが起こった組換え細胞（または組換え生物）を選別できることを見出し、上述の本発明の選別方法を完成するに至った。即ち、本発明の選別方法を用いれば、上述した従来の方法に問題点を容易に解決することが可能である。

【0031】本発明は、さらに、上述した本発明のターゲティングDNAの製造方法により作製されるターゲティングDNA、該ターゲティングDNAを用いて作製される組換え細胞または組換え生物（組換え細菌、組換えウイルス、組換え非ヒト哺乳動物、組換え植物など）に関する。該組換え体の作製においては、必要に応じ前記に概略した本発明の組換え細胞等の選別方法を用いることができる。

【0032】本発明は、さらなる1つは、cDNAライブラリーから所望のアミノ酸配列または蛋白質をコードするcDNAを保持するクローン（陽性クローン）を同定、取得する（スクリーニング）方法に関し、例えば、下記の工程を含む方法である。

- ①市販のcDNAライブラリーまたは独自に作製したcDNAライブラリーを準備する。
- ②既知のアミノ酸配列をコードする塩基配列または既知の蛋白質をコードする塩基配列（ORF、5' UTRまたは3' UTR）を基に設計される一対のプライマーであって、逆PCR反応（inverse PCR；inside-out PCR）により、該cDNAライブラリーの特定のクローン（環状DNAクローン）の塩基配列を、該プライマーがアニーリングした部位から互いに外向きに塩基配列を増幅し得る一対のプライマーDNAを調製する。さらに所望に応じ、該一対のプライマーDNAの各々は、その5'末端に所望の制限酵素認識塩基配列を有することができる。
- ③該cDNAライブラリーの各々のクローンを鋳型とし、該各々のクローンに対して該一対のプライマーDNAを用いて逆PCR反応を行う。
- ④各々のクローンについてのPCR産物をゲル電気泳動に供することにより、遺伝子増幅の有無を確認し、遺伝子増幅の認められるクローンを同定し、目的の陽性クローンとして得る。
- ⑤所望に応じ、該陽性クローンの塩基配列を決定し、該クローンに目的のアミノ酸配列または蛋白質をコードする塩基配列（cDNA）が保持されていることを確認する。

本発明のcDNAのスクリーニング方法を用いれば、従来必要とした複数回のPCR反応といった煩雑な操作が不要とされ、所望のcDNAクローンを極めて簡便且つ迅速に同定、取得（選別）することができる。

【0033】さらに本発明の他の1つは、生物（例えば、マウスまたはヒトなどの哺乳動物）のゲノムDNAライブラリーに関する。具体的には、約5乃至12Kbの遺伝子長を有するゲノムDNA断片を、適切なプラスミドやファージに挿入してなる環状ゲノムDNAクローンからなるゲノムDNAライブラリーである。該ライブラリーは、該環状ゲノムDNAクローンの各々を、例えば、多数のウェルを有するマイクロプレートに配備してなるライブラリーである。本発明のゲノムDNAライブラリーを用いれば、上述した相同組換え用ターゲティングDNAの作製で必要とする所望のゲノムDNA断片を極めて簡便に取得することが可能である。

【0034】本発明は、具体的には下記のとおりである。

（1）生物の内在性ゲノムDNA中のDNA配列の一部を、相同組換えにより修飾するためのターゲティングDNAの製造方法であって、下記工程（a）乃至（e）の工程：

（a）該生物のゲノムDNA断片であって該DNA配列[T]を含むゲノムDNA断片を含むDNA[CL]を、制限酵素[E1]により、該DNA配列[T]の外側に各々存在する制限酵素[E1]により切断可能な制限酵素認識DNA配列[X]で切断し、該制限酵素[E1]による切断末端DNA配列を両端に有し且つ該DNA配列[T]を含むゲノムDNA断片[L1]を調製する工程；

（b）該ゲノムDNA断片[L1]を該切断末端DNA配列で分子内連結させることにより、制限酵素認識DNA配列[X]及び該DNA配列[T]を含む環状ゲノムDNA[C1]を調製する工程；

（c）該環状ゲノムDNA[C1]の各々のDNA鎖を鋳型とし、下記プライマーDNA[P1]及びプライマーDNA[P2]：プライマーDNA[P1]：5'末端近傍に制限酵素[E2]により切断可能な制限酵素認識DNA配列を有し、且つその下流に該環状ゲノムDNA[C1]の一方のDNA鎖[I]中のDNA配列[T]の5'末端側のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[I]中のDNA配列[T]の5'末端側にアニーリングし得るように設計されたプライマーDNA；及び

プライマーDNA[P2]：5'末端近傍に制限酵素[E3]により切断可能な制限酵素認識DNA配列を有し、且つその下流に該環状ゲノムDNA[C1]の他方のDNA鎖[II]中のDNA配列[T]の5'末端側のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[II]中のDNA配列[T]の5'末端側にアニーリングし得るように設計されたプライマーDNA、を用いた逆ポリメラーゼ連鎖反応に

よるDNA増幅により、下記のDNA鎖[III]及びDNA鎖[IV]：

DNA鎖[III]：該プライマーDNA[P1]に相補的なDNA配列及び該プライマーDNA[P2]と同一のDNA配列の各々を末端に有し、且つ制限酵素認識DNA配列[X]を含むDNA鎖；及び

DNA鎖[IV]：該プライマーDNA[P1]と同一のDNA配列及び該プライマーDNA[P2]に相補的なDNA配列の各々を末端に有し、且つ制限酵素認識DNA配列[X]を含むDNA鎖、とからなる組換えゲノムDNA断片[L2]を調製する工程；

(d) 該組換えゲノムDNA断片[L2]の末端を制限酵素[E2]及び制限酵素[E3]で消化して組換えゲノムDNA断片[L2']を得、該組換えゲノムDNA断片[L2']を、制限酵素[E2]による切断末端DNA配列及び制限酵素[E3]による切断末端DNA配列を各々の末端に有し、且つ該生物にとって外来である外来性DNAを該外来性DNAが細胞中で発現できるような配置で含む線状化発現ベクターDNAと連結させることにより環状ゲノムDNA[C2]を調製する工程；及び

(e) 該環状ゲノムDNA[C2]を制限酵素[E1]により制限酵素認識DNA配列[X]で切断して得られる組換えゲノムDNA断片[L3]をターゲティングDNAとして回収する工程、を含むことを特徴とするターゲティングDNAの製造方法。

【0035】(2) 該外来性DNAが、マーカー遺伝子からなるDNAであることを特徴とする前記(1)に記載の製造方法。

(3) 該外来性DNAが、マーカー遺伝子及びレポーター遺伝子からなるDNAであることを特徴とする前記(1)に記載の製造方法。

(4) 該レポーター遺伝子が、ルシフェラーゼまたはβラクタマーゼをコードする遺伝子であることを特徴とする前記(3)に記載の製造方法。

(5) 該マーカー遺伝子が、ネオマイシン耐性遺伝子であることを特徴とする前記(2)乃至前記(4)のいずれかに記載の製造方法。

(6) 該制限酵素[E2]と制限酵素[E3]が同一の制限酵素であることを特徴とする前記(1)乃至前記(5)のいずれかに記載の製造方法。

(7) 該制限酵素[E2]と制限酵素[E3]が各々異なる制限酵素であることを特徴とする前記(1)乃至前記(5)のいずれかに記載の製造方法。

(8) 該生物が、脊椎動物、昆虫、原生動物、植物、細菌またはウイルスであることを特徴とする前記(1)乃至前記(7)のいずれかに記載の製造方法。

(9) 該脊椎動物が、非ヒト哺乳動物であることを特徴とする前記(8)に記載の製造方法。

(10) 該非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする前記(9)に記載の製造方法。

(11) 該DNA[CL]が、マウスのゲノムDNA断片をバクテリア人工染色体(BAC)または酵母人工染色体(YAC)中にクローン化してなるマウスゲノムDNA断片のライブラリーから選別されるものであることを特徴とする前記(10)に記載の製造方法。

(12) 該修飾が、該DNA配列[T]のmRNAへの転写を不能たらしめ、且つ該外来性DNAの発現を可能たらしめるものであることを特徴とする前記(1)乃至前記(11)のいずれかに記載の製造方法。

【0036】(13) 生物の内在性ゲノムDNA中のDNA配列の一部を、相同組換えにより修飾するためのターゲティングDNAの製造方法であって、下記工程(a)乃至(f)の工程：

(a) 該生物のゲノムDNA断片であって該DNA配列[T]を含むゲノムDNA断片を含むDNA[CL]を、制限酵素[E1]により、該DNA配列[T]の外側に各々存在する制限酵素[E1]により切断可能な制限酵素認識DNA配列[X]で切断し、該制限酵素[E1]による切断末端DNA配列を両端に有し且つ該DNA配列[T]を含むゲノムDNA断片[L1]を調製する工程；

(b) 該ゲノムDNA断片[L1]を該切断末端DNA配列で分子内連結させることにより、制限酵素認識DNA配列[X]及び該DNA配列[T]を含む環状ゲノムDNA[C1]を調製する工程；

(c) 該環状ゲノムDNA[C1]の各々のDNA鎖を鋳型とし、下記プライマーDNA[P1]及びプライマーDNA[P2]：プライマーDNA[P1]：5'末端近傍に制限酵素[E2]により切断可能な制限酵素認識DNA配列を有し、且つその下流に該環状ゲノムDNA[C1]の一方のDNA鎖[I]中のDNA配列[T]の5'末端側のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[I]中のDNA配列[T]の5'末端側にアニーリングし得るように設計されたプライマーDNA；及び

プライマーDNA[P2]：5'末端近傍に制限酵素[E3]により切断可能な制限酵素認識DNA配列を有し、且つその下流に該環状ゲノムDNA[C1]の他方のDNA鎖[II]中のDNA配列[T]の5'末端側のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[II]中のDNA配列[T]の5'末端側にアニーリングし得るように設計されたプライマーDNA、を用いた逆ポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅により、下記のDNA鎖[III]及びDNA鎖[IV]：

DNA鎖[III]：該プライマーDNA[P1]に相補的なDNA配列及び該プライマーDNA[P2]と同一のDNA配列の各々を末端に有し、且つ制限酵素認識DNA配列[X]を含むDNA鎖；及び

DNA鎖[IV]：該プライマーDNA[P1]と同一のDNA配列及び該プライマーDNA[P2]に相補的なDNA配列

の各々を末端に有し、且つ制限酵素認識DNA配列[X]を含むDNA鎖、とからなる組換えゲノムDNA断片[L2]を調製する工程；

(d) 該組換えゲノムDNA断片[L2]の末端を制限酵素[E2]及び制限酵素[E3]で消化して組換えゲノムDNA断片[L2']を得、該組換えゲノムDNA断片[L2']を、制限酵素[E2]による切断末端DNA配列及び制限酵素[E3]による切断末端DNA配列を各々の末端に有し、且つ該生物にとって外来である外来性DNAを該外来性DNAが細胞中で発現できるような配置で含む線状化発現ベクターDNAと連結させることにより環状ゲノムDNA[C2]を調製する工程；及び

(e) 該環状ゲノムDNA[C2]を、制限酵素[E1]により切断し、該制限酵素切断部位に制限酵素[E4]により切断可能な制限酵素認識DNA配列[Y]を含むリンカーDNAを挿入することにより、該制限酵素認識DNA配列[Y]及び該標的DNA配列[T]を含む組換え環状ゲノムDNA[C3]を調製する工程；

(f) 該環状ゲノムDNA[C3]を制限酵素[E4]により制限酵素認識DNA配列[Y]で切断して得られる組換えゲノムDNA断片[L3]をターゲティングDNAとして回収する工程、を含むことを特徴とするターゲティングDNAの製造方法。

【0037】(14) 該外来性DNAが、マーカー遺伝子からなるDNAであることを特徴とする前記(13)に記載の製造方法。

(15) 該外来性DNAが、マーカー遺伝子及びレポーター遺伝子からなるDNAであることを特徴とする前記(13)に記載の製造方法。

(16) 該レポーター遺伝子が、ルシフェラーゼまたはβラクタマーゼをコードする遺伝子であることを特徴とする前記(15)に記載の製造方法。

(17) 該マーカー遺伝子が、ネオマイシン耐性遺伝子であることを特徴とする前記(14)乃至前記(16)のいずれかに記載の製造方法。

(18) 該制限酵素[E2]と制限酵素[E3]が同一の制限酵素であることを特徴とする前記(13)乃至前記(17)のいずれかに記載の製造方法。

(19) 該制限酵素[E2]と制限酵素[E3]が各々異なる制限酵素であることを特徴とする前記(13)乃至前記(17)のいずれかに記載の製造方法。

(20) 該生物が、脊椎動物、昆虫、原生動物、植物、細菌またはウイルスであることを特徴とする前記(13)乃至前記(19)のいずれかに記載の製造方法。

(21) 該脊椎動物が、非ヒト哺乳動物であることを特徴とする前記(20)に記載の製造方法。

(22) 該非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする前記(21)に記載の製造方法。

(23) 該DNA[CL]が、マウスのゲノムDNA断片をバクテリア人工染色体(BAC)または酵母人工染色体(YA

C)中にクローン化してなるマウスゲノムDNA断片のライブラリーから選別されるものであることを特徴とする前記(22)に記載の製造方法。

(24) 該修飾が、該DNA配列[T]のmRNAへの転写を不能たらしめ、且つ該外来性DNAの発現を可能たらしめるものであることを特徴とする前記(13)乃至前記(23)のいずれかに記載の製造方法。

【0038】(25) 生物の内在性ゲノムDNA中のDNA配列の一部を、相同組換えにより修飾するためのターゲティングDNAの製造方法であって、下記工程(a)乃至(e)の工程；

(a) 該生物のゲノムDNA断片であって該DNA配列[T]を含むゲノムDNA断片を含むDNA[CL]を、制限酵素[E1]により、該DNA配列[T]の外側に各々存在する制限酵素[E1]により切断可能な制限酵素認識DNA配列[X]で切断し、該制限酵素[E1]による切断末端DNA配列を両端に有し且つ該DNA配列[T]を含むゲノムDNA断片[L1]を調製する工程；

(b) 該ゲノムDNA断片[L1]と、制限酵素[E4]により切断可能な制限酵素認識DNA配列[Y]を含むリンカーDNAとを連結させることにより、制限酵素認識DNA配列[Y]及び該DNA配列[T]を含む環状ゲノムDNA[C1]を調製する工程；

(c) 該組換え環状ゲノムDNA[C1]の各々のDNA鎖を鋳型とし、下記プライマーDNA[P1]及びプライマーDNA[P2]；

プライマーDNA[P1]：5'末端近傍に制限酵素[E2]により切断可能な制限酵素認識DNA配列を有し、且つその下流に該環状ゲノムDNA[C1]の一方のDNA鎖[I]中のDNA配列[T]の5'末端側のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[I]中のDNA配列[T]の5'末端側にアニーリングし得るように設計されたプライマーDNA；及び

プライマーDNA[P2]：5'末端近傍に制限酵素[E3]により切断可能な制限酵素認識DNA配列を有し、且つその下流に該環状ゲノムDNA[C1]の他方のDNA鎖[II]中のDNA配列[T]の5'末端側のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[II]中のDNA配列[T]の5'末端側にアニーリングし得るように設計されたプライマーDNA、を用いた逆ポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅により、下記のDNA鎖[III]及びDNA鎖[IV]；

DNA鎖[III]：該プライマーDNA[P1]に相補的なDNA配列及び該プライマーDNA[P2]と同一のDNA配列の各々を末端に有し、且つ制限酵素認識DNA配列[Y]を含むDNA鎖；及び

DNA鎖[IV]：該プライマーDNA[P1]と同一のDNA配列及び該プライマーDNA[P2]に相補的なDNA配列

の各々を末端に有し、且つ制限酵素認識DNA配列[Y]を含むDNA鎖、とからなる組換えゲノムDNA断片[L2]を調製する工程；

(d) 該組換えゲノムDNA断片[L2]の末端を制限酵素[E2]及び制限酵素[E3]で消化して組換えゲノムDNA断片[L2']を得、該組換えゲノムDNA断片[L2']を、制限酵素[E2]による切断末端DNA配列及び制限酵素[E3]による切断末端DNA配列を各々の末端に有し、且つ該生物にとって外来である外来性DNAを該外来性DNAが細胞中で発現できるような配置で含む線状化発現ベクターDNAと連結させることにより環状ゲノムDNA[C2]を調製する工程；及び

(e) 該環状ゲノムDNA[C2]を制限酵素[E4]により制限酵素認識DNA配列[Y]で切断して得られる組換えゲノムDNA断片[L3]をターゲティングDNAとして回収する工程、を含むことを特徴とするターゲティングDNAの製造方法。

【0039】(26) 該外来性DNAが、マーカー遺伝子からなるDNAであることを特徴とする前記(25)に記載の製造方法。

(27) 該外来性DNAが、マーカー遺伝子及びレポーター遺伝子からなるDNAであることを特徴とする前記(25)に記載の製造方法。

(28) 該レポーター遺伝子が、ルシフェラーゼまたは β ラクタマーゼをコードする遺伝子であることを特徴とする前記(27)に記載の製造方法。

(29) 該マーカー遺伝子が、ネオマイシン耐性遺伝子であることを特徴とする前記(25)乃至前記(28)のいずれかに記載の製造方法。

(30) 該制限酵素[E2]と制限酵素[E3]が同一の制限酵素であることを特徴とする前記(25)乃至前記(29)のいずれかに記載の製造方法。

(31) 該制限酵素[E2]と制限酵素[E3]が各々異なる制限酵素であることを特徴とする前記(25)乃至前記(29)のいずれかに記載の製造方法。

(32) 該生物が、脊椎動物、昆虫、原生動物、植物、細菌またはウイルスであることを特徴とする前記(25)乃至前記(31)のいずれかに記載の製造方法。

(33) 該脊椎動物が、非ヒト哺乳動物であることを特徴とする前記(32)に記載の製造方法。

(34) 該非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする前記(33)に記載の製造方法。

(35) 該DNA[CL]が、マウスのゲノムDNA断片をバクテリア人工染色体(BAC)または酵母人工染色体(YAC)中にクローン化してなるマウスゲノムDNA断片のBACライブラリーから選別されるものであることを特徴とする前記(34)に記載の製造方法。

(36) 該修飾が、該DNA配列[T]のmRNAへの転写を不能たらしめ、且つ該外来性DNAの発現を可能たらしめるものであることを特徴とする前記(25)乃至前記(3

5)のいずれかに記載の製造方法。

【0040】(37) 生物の内在性ゲノムDNA中のDNA配列の一部を、相同組換えにより修飾するためのターゲティングDNAの製造方法であって、下記工程(a)乃至(c)の工程；

(a) 該生物のゲノムDNA断片であって該DNA配列[T]を含むゲノムDNA断片[L1]と制限酵素[E1]で切断可能な制限酵素認識DNA配列[X]を有する発現ベクターDNAとからなる環状ゲノムDNA[C1]の各々のDNA鎖を鋳型とし、下記プライマーDNA[P1]及びプライマーDNA[P2]；

プライマーDNA[P1]：5'末端近傍に制限酵素[E2]により切断可能な制限酵素認識DNA配列を有し、且つその下流に該環状ゲノムDNA[C1]の一方のDNA鎖[I]中のDNA配列[T]の5'末端側のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[I]中のDNA配列[T]の5'末端側にアニーリングするように設計されたプライマーDNA；及び

プライマーDNA[P2]：5'末端近傍に制限酵素[E3]により切断可能な制限酵素認識DNA配列を有し、且つその下流に該環状ゲノムDNA[C1]の他方のDNA鎖[II]中のDNA配列[T]の5'末端側のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[II]中のDNA配列[T]の5'末端側にアニーリングするように設計されたプライマーDNA、を用いた逆ポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅により、下記DNA鎖[III]及びDNA鎖[IV]；

DNA鎖[III]：該プライマー[P1]に相補的なDNA配列及び該プライマーDNA[P2]と同一のDNA配列を各々の末端に有し、且つ制限酵素認識DNA配列[X]を含むDNA鎖；及び

DNA鎖[IV]：該プライマー[P1]と同一のDNA配列及び該プライマーDNA[P2]に相補的なDNA配列を各々の末端に有し、且つ制限酵素認識DNA配列[X]を含むDNA鎖、とからなる組換えゲノムDNA断片[L2]を調製する工程；

(b) 該組換えゲノムDNA断片[L2]の末端を制限酵素[E2]及び制限酵素[E3]で消化して組換えゲノムDNA断片[L2']を得、該組換えゲノムDNA断片[L2']を、制限酵素[E2]による切断末端DNA配列及び制限酵素[E3]による切断末端DNA配列を各々の末端に有する該生物にとって外来である外来性DNAと連結させることにより環状ゲノムDNA[C3]を調製する工程；及び

(c) 該環状ゲノムDNA[C2]を制限酵素[E1]により制限酵素認識DNA配列[X]で切断して得られる組換えゲノムDNA断片[L3]をターゲティングDNAとして回収する工程、を含むことを特徴とするターゲティングDNAの製造方法。

【0041】 (38) 下記工程 (a2) 乃至 (a4) :

(a2) 工程 (a) で得た組換えゲノムDNA断片[L2]を分子内連結することにより環状ゲノムDNA[C2]を調製する工程;

(a3) 宿主を該環状ゲノムDNA[C2]で形質転換することにより得られる形質転換宿主を培養することにより該環状ゲノムDNA[C2]を増幅する工程; 及び

(a4) 該環状ゲノムDNA[C2]を制限酵素[E2]及び/または制限酵素[E3]により該分子内連結部位で切断して、所望の量の該組換えゲノムDNA断片[L2]を調製する工程、をさらに含むことを特徴とする前記 (37) に記載の製造方法。

(39) 該外来性DNAが、マーカー遺伝子からなるDNAであることを特徴とする前記 (37) または前記 (38) に記載の製造方法。

(40) 該外来性DNAが、マーカー遺伝子及びレポーター遺伝子からなるDNAであることを特徴とする前記 (37) または前記 (38) に記載の製造方法。

(41) 該レポーター遺伝子が、ルシフェラーゼまたはβラクタマーゼをコードする遺伝子であることを特徴とする前記 (40) に記載の製造方法。

(42) 該制限酵素[E2]と制限酵素[E3]が同一の酵素であることを特徴とする前記 (37) 乃至前記 (41) のいずれかに記載の製造方法。

(43) 該制限酵素[E2]と制限酵素[E3]が各々異なる酵素であることを特徴とする前記 (37) 乃至前記 (41) のいずれかに記載の製造方法。

(44) 該生物が、脊椎動物、昆虫、原生動物、植物、細菌またはウイルスであることを特徴とする前記 (37) 乃至前記 (43) のいずれかに記載の製造方法。

(45) 該脊椎動物が、非ヒト哺乳動物であることを特徴とする前記 (44) に記載の製造方法。

(46) 該非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする前記 (45) に記載の製造方法。

(47) 該ゲノムDNA断片[L1]が、マウスのゲノムDNA断片をバクテリア人工染色体 (BAC) または酵母人工染色体 (YAC) 中にクローン化してなるマウスゲノムDNA断片のライブラリーから選別されたクローン中に含まれるマウスゲノムDNA断片に由来するものであることを特徴とする前記 (46) に記載の製造方法。

【0042】 (48) 該環状ゲノムDNA[C1]が、該生物のゲノムDNAを制限酵素で消化して得られる任意のゲノムDNA断片の各々と制限酵素[E1]で切断可能な制限酵素認識DNA配列[X]を有する発現ベクターDNAとからなる複数種類の環状ゲノムDNAからなるゲノムDNAライブラリー中に含まれていることを特徴とする前記 (37) 乃至前記 (47) のいずれかに記載の製造方法。

(49) 該ゲノムDNAライブラリーが、該環状ゲノムDNAを複数のウェルを有するマイクロプレートに配備してなるゲノムDNAライブラリーであることを特徴とす

る前記 (48) に記載の製造方法。

(50) 該環状ゲノムDNA中に含まれる該ゲノムDNA断片の大きさが、約5乃至約12Kbであることを特徴とする前記 (48) または前記 (49) に記載の製造方法。

(51) 約5乃至約12Kbの大きさの生物のゲノムDNA断片を発現ベクターにクローン化してなる複数種類のクローンからなるゲノムDNA断片ライブラリー。

(52) 該ゲノムDNAライブラリーが、該クローンの各々を多数のウェルを有するマイクロプレートに配備してなることを特徴とする前記 (51) に記載のゲノムDNAライブラリー。

(53) 前記 (1) 乃至前記 (50) のいずれかに記載の製造方法により得られるターゲティングDNA。

(54) 内在性ゲノムDNA中の一部のDNA配列が修飾された組換え細胞、組換え細菌または組換えウイルスの製造方法であって、生物の細胞、細菌またはウイルスを前記 (1) 乃至前記 (12) または前記 (37) 乃至前記 (50) のいずれかに記載の製造方法により製造されるターゲティングベクターDNAで形質転換し、該ターゲティングDNAと該内在性ゲノムDNAとの間の相同組換えの結果、該内在性ゲノムDNAに該ターゲティングベクターDNAが組込まれている細胞、細菌またはウイルスを選別し、取得することからなる製造方法。

(55) 内在性ゲノムDNA中の一部のDNA配列が修飾された組換え細胞、組換え細菌または組換えウイルスの製造方法であって、生物の細胞、細菌またはウイルスを前記 (13) 乃至前記 (36) のいずれかに記載の製造方法により製造されるターゲティングベクターDNAで形質転換し、該ターゲティングDNAと該内在性ゲノムDNAとの間の相同組換えの結果、該内在性ゲノムDNAに該ターゲティングベクターDNAが組込まれている細胞、細菌またはウイルスを選別し、取得することからなる製造方法。

【0043】 (56) 該細胞、細菌またはウイルスの選別が、下記の工程:

a) 該細胞、細菌またはウイルスの内在性ゲノムDNAの各々のDNA鎖を鋳型とし、下記のプライマーDNA[P3]及びプライマーDNA[P4]:

プライマーDNA[P3]: 該ターゲティングベクターDNAの一方のDNA鎖の3'末端側の該リンカーDNA由来のDNA配列及びそれに隣接する制限酵素[E4]による切断末端DNA配列の一部に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA; 及び、

プライマーDNA[P4]: 該ターゲティングベクターDNAの他方のDNA鎖に含まれる該外来性DNAの一部のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA、を用いたポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅を行う工程; 及び

b) ゲル電気泳動によりDNAの増幅が認められない細胞、細菌またはウイルスを同定し、回収する工程、を含

むことを特徴とする前記（55）に記載の製造方法。

【0044】（57）該細胞、細菌またはウイルスの選別が、下記の工程：

a）該細胞、細菌またはウイルスの内在性ゲノムDNAの各々のDNA鎖を鋳型とし、下記のプライマーDNA[P3]及びプライマーDNA[P4]：

プライマーDNA[P3]：該ターゲティングベクターDNAの一方のDNA鎖[I]の3'末端側の該リンカーDNA由来のDNA配列及びそれに隣接する制限酵素[E4]による切断末端DNA配列の一部に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA；及び、

プライマーDNA[P4]：該ターゲティングベクターDNAの他方のDNA鎖[II]に含まれる該外来性DNAの一部のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA、を用いたポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅を行う工程；

b）ゲル電気泳動によりDNAの増幅が認められない細胞、細菌またはウイルスを同定する工程；

c）工程b）で同定された細胞、細菌またはウイルスの内在性ゲノムDNAの各々のDNA鎖を鋳型とし、下記のプライマーDNA[P5]及びプライマーDNA[P6]：

プライマーDNA[P5]：該ターゲティングベクターDNAの該DNA鎖[II]の3'末端側の該リンカーDNA由来のDNA配列及びそれに隣接する制限酵素[E4]による切断末端DNA配列の一部に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA；及び、

プライマーDNA[P6]：該ターゲティングベクターDNAの該DNA鎖[I]に含まれる該外来性DNAの一部のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA、を用いたポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅を行う工程；及び

d）ゲル電気泳動によりDNAの増幅が認められない細胞、細菌またはウイルスを同定し、回収する工程、を含むことを特徴とする前記（55）に記載の製造方法。

【0045】（58）該細胞、細菌またはウイルスの選別が、下記の工程：

a）該細胞、細菌またはウイルスの内在性ゲノムDNAの各々のDNA鎖を鋳型とし、下記のプライマーDNA[P3]及びプライマーDNA[P4]：

プライマーDNA[P3]：該ターゲティングベクターDNAの一方のDNA鎖[I]の3'末端側の該リンカーDNA由来のDNA配列及びそれに隣接する制限酵素[E4]による切断末端DNA配列の一部に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA；及び、

プライマーDNA[P4]：該ターゲティングベクターDNAの他方のDNA鎖[II]に含まれる該外来性DNAの一部のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA、を用いたポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅を行う工程；

b）ゲル電気泳動によりDNAの増幅が認められない細胞、細菌またはウイルスを同定する工程；

細胞、細菌またはウイルスを同定する工程；

c）工程b）で同定された細胞、細菌またはウイルスの内在性ゲノムDNAの各々のDNA鎖を鋳型とし、下記のプライマーDNA[P5]及びプライマーDNA[P6]：

プライマーDNA[P5]：該ターゲティングベクターDNAの該DNA鎖[II]の3'末端側の該リンカーDNA由来のDNA配列及びそれに隣接する制限酵素[E4]による切断末端DNA配列の一部に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA；及び、

プライマーDNA[P6]：該ターゲティングベクターDNAの該DNA鎖[I]に含まれる該外来性DNAの一部のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA、を用いたポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅を行う工程；

d）ゲル電気泳動によりDNAの増幅が認められない細胞、細菌またはウイルスを同定する工程；

e）該ターゲティングDNAの各々のDNA鎖を鋳型とし、該プライマーDNA[P3]及びプライマーDNA[P5]を用いたポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅を行う工程；

f）増幅されたDNAの各々の末端側に存在する制限酵素認識DNA配列[X]に隣接する内側のDNA配列を決定する工程；

g）工程d）で同定された細胞、細菌またはウイルスの内在性ゲノムDNAの各々のDNA鎖を鋳型とし、工程f）で決定されたDNA配列を基に下記のプライマーDNA[P7]及びプライマーDNA[P8]：プライマーDNA[P7]：該ターゲティングベクターDNAの該DNA鎖[I]の3'末端側に存在する制限酵素認識DNA配列[X]及びそれに隣接する内側のDNA配列の一部に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA；及び、

プライマーDNA[P8]：該ターゲティングベクターDNAの該DNA鎖[II]の3'末端側に存在する制限酵素認識DNA配列[X]及びそれに隣接する内側のDNA配列の一部に相補的なDNA配列を有するプライマーDNA、を用いたポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅を行う工程；及び、

h）ゲル電気泳動によりDNAの増幅が認められる細胞、細菌またはウイルスを同定し、回収する工程；を含むことを特徴とする前記（55）に記載の製造方法。

【0046】（59）該生物の細胞が、脊椎動物、昆虫、原生動物、及び植物からなる群から選ばれるいずれかの生物の細胞であることを特徴とする前記（54）乃至前記（58）のいずれかに記載の製造方法。

（60）該脊椎動物が、非ヒト哺乳動物であることを特徴とする前記（59）に記載の製造方法。

（61）該非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする前記（60）に記載の方法。

（62）該ターゲティングベクターDNAが、前記（11）、前記（23）、前記（35）または前記（47）のい

れかに記載の製造方法により製造されるターゲティングベクターDNAであることを特徴とする前記(61)に記載の製造方法。

(63) 該細胞が、胚性幹細胞であることを特徴とする前記(60)乃至前記(62)のいずれかに記載の製造方法。

(64) 該修飾が、該DNA配列のmRNAへの転写を不能たらしめ、且つ該外来性DNAの発現を可能たらしめるものであることを特徴とする前記(54)乃至前記(63)のいずれかに記載の製造方法。

(65) 前記(54)乃至前記(64)のいずれかに記載の製造方法により得られる組換え細胞、組換え細菌または組換えウイルス。

(66) 前記(63)に記載の製造方法により得られる組換え胚性幹細胞。

【0047】(67) 内在性ゲノムDNA中の一部のDNA配列が修飾された組換え非ヒト哺乳動物の製造方法であって、下記(a)乃至(e)の工程：

(a) 雌性非ヒト哺乳動物[A]の受精卵に、前記(63)に記載の製造方法により得られる組換え胚性幹細胞を注入し組換え受精卵を得る工程；

(b) 該組換え受精卵を、雌性非ヒト哺乳動物[B]の子宮に移植する工程；及び、

(c) 該雌性非ヒト哺乳動物[B]が出産する雄性または雌性の胎児[P]を得る工程、

(d) 下記(1)または(2)のいずれかの工程：

(1) 該胎児[P]が成長してなる雄性非ヒト哺乳動物[C]を雌性非ヒト哺乳動物[D]と交配させ該雌性非ヒト哺乳動物[D]が出産する雄性または雌性の胎児[Q]を得る工程；または、

(2) 該胎児[P]が成長してなる雌性非ヒト哺乳動物[C]を雄性非ヒト哺乳動物[D]と交配させ該雌性非ヒト哺乳動物[C]が出産する雄性または雌性の胎児[Q]を得る工程；

(e) 該胎児[Q]が成長してなる雄性または雌性の非ヒト哺乳動物[E]から、該組換え胚性幹細胞のゲノムDNA中の修飾に由来する修飾を、一対の染色体の一方に有する雄性または雌性の該非ヒト哺乳動物[E]を選別し、組換え非ヒト哺乳動物として得る工程、からなることを特徴とする製造方法。

【0048】(68) 該雌性非ヒト哺乳動物[A]と該雌性非ヒト哺乳動物[B]とが同一の個体であることを特徴とする前記(67)に記載の製造方法。

(69) 該雌性非ヒト哺乳動物[A]と該雌性非ヒト哺乳動物[B]とが各々異なる個体であることを特徴とする前記(67)に記載の製造方法。

(70) 前記(67)乃至前記(69)のいずれかに記載の製造方法であって、さらに下記の工程(f)及び(g)：

(f) 下記(1)または(2)のいずれかの工程：

(1) 工程(e)で得られた雄性組換え非ヒト哺乳動物[E]を雌性非ヒト哺乳動物[F]と交配させ該雌性非ヒト哺乳動物[F]が出産する雄性または雌性の胎児[R]を得る工程；または、

(2) 工程(e)で得られた雌性組換え非ヒト哺乳動物[E]を雄性非ヒト哺乳動物[F]と交配させ該雌性非ヒト哺乳動物[E]が出産する雄性または雌性の胎児[R]を得る工程；及び、

(g) 該胎児[R]が成長してなる雄性または雌性の非ヒト哺乳動物[G]から、該組換え胚性幹細胞のゲノムDNA中の修飾に由来する修飾を、一対の染色体の両方に有する雄性または雌性の該非ヒト哺乳動物[G]を選別し、組換え非ヒト哺乳動物として得る工程、からなることを特徴とする製造方法。

【0049】(71) 該工程(d)が、雄性非ヒト哺乳動物[C]を雌性非ヒト哺乳動物[D]と交配させ該雌性非ヒト哺乳動物[C]が出産する雄性または雌性の胎児[Q]を得る工程からなることを特徴とする前記(67)乃至前記(70)のいずれかに記載の製造方法。

(72) 該工程(f)が、雄性組換え非ヒト哺乳動物[E]を雌性非ヒト哺乳動物[F]と交配させ該雌性非ヒト哺乳動物[F]が出産する雄性または雌性の胎児[R]を得る工程からなることを特徴とする前記(70)または前記(71)に記載の製造方法。

(73) 該修飾が、該DNA配列のmRNAへの転写を不能たらしめ、且つ該外来性DNAの発現を可能たらしめるものであることを特徴とする前記(67)乃至前記(72)のいずれかに記載の製造方法。

(74) 該非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする前記(67)乃至前記(73)のいずれかに記載の製造方法。

【0050】(75) cDNAライブラリーに含まれる所望のcDNAを保持するクローンを同定し取得する方法であって、下記工程(a)乃至(c)：

(a) 該cDNAライブラリーの各々のクローンに対して、下記プライマーDNA[P1]及びプライマーDNA[P2]：

プライマーDNA[P1]：該所望のcDNAの一方のDNA鎖[I]の一部のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[I]の一部のDNA配列の5'末端側にアニーリングするように設計されたプライマーDNA；及び

プライマーDNA[P2]：該所望のcDNAの他方のDNA鎖[II]の一部のDNA配列に相補的なDNA配列を有するプライマーDNAであって、該プライマーDNAの3'末端が該DNA鎖[II]の一部のDNA配列の5'末端側にアニーリングするように設計されたプライマーDNA、を用いた逆ポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅を施す工程；

(b) ゲル電気泳動によりDNA増幅が認められるクローンを同定する工程；及び

(c) 該同定したクローンを取得する工程、からなる方法。

【0051】(76) 該cDNAライブラリーが、各々のクローンを多数のウェルを有するマイクロプレートに配備してなるcDNAライブラリーであることを特徴とする前記(75)に記載の方法。

(77) 該所望のcDNAが、オープンリーディングフレーム(ORF)を含むことを特徴とする前記(75)または前記(76)に記載の方法。

(78) 該所望のcDNAが、3'UTR、ORF及び5'UTRを含むことを特徴とする前記(75)乃至前記(77)のいずれかに記載の方法。

(79) 該プライマー[P1]及びプライマー[P2]の各々が、下記のいずれか：

(a) 該所望のcDNAのORFにアニーリングする；

(b) 一方が該所望のcDNAのORFにアニーリングし、及び他方が該所望のcDNAの5'UTRにアニーリングする；

(c) 一方が該所望のcDNAのORFにアニーリングし、及び他方が該所望のcDNAの3'UTRにアニーリングする；または

(d) 一方が該所望のcDNAの5'UTRにアニーリングし、及び他方が該所望のcDNAの3'UTRにアニーリングする、

の特徴を有するものであることを特徴とする前記(75)乃至前記(78)のいずれかに記載の方法。

(80) 該cDNAライブラリーが、哺乳動物のmRNAに対応するcDNAのライブラリーであることを特徴とする前記(75)乃至前記(79)のいずれかに記載の方法。

(81) 該哺乳動物が、マウス、ラットまたはヒトであることを特徴とする前記(80)に記載の方法。

(82) 配列番号25に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクをコードするDNAまたはその断片。

(83) 配列番号24に記載される塩基配列を含むDNAまたはその断片。

(84) 配列番号24に記載される塩基配列の塩基番号3乃至524の塩基を含むDNAまたはその断片。

(85) 配列番号25に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクまたはその断片。

(86) 前記(82)乃至前記(84)のいずれかに記載のDNA若しくはその断片を含む発現ベクター。

(97) 前記(86)に記載の発現ベクターで形質転換された形質転換細胞。

【0052】

【発明の実施の形態】以下、本発明で用いる語句の意味を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。本発明における「生物」とは、脊椎動物、昆虫、原生動物、植物、細菌及びウイルス等のあらゆる生命体を意味する。好ましくは脊椎動物、細菌またはウイルスであ

り、さらに好ましくは脊椎動物またはウイルスであり、特に好ましくは脊椎動物である。

【0053】脊椎動物としては、ヒト以外の哺乳動物

(非ヒト哺乳動物)が好ましい。非ヒト哺乳動物としては、サル、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、ハムスター、モルモット、及びマウス等を挙げることができ、好ましくはマウスである。植物としては、食用植物、森林植物、観葉植物、あるいは雑草などのあらゆる植物を挙げることができる。細菌としては、例えば、外毒素または内毒素を産生する種々の細菌が好ましく、例えば、グラム陽性病原菌(例えば、ジフテリア菌、破傷風菌、ガス壊疽菌、ボツリヌス菌、百日咳菌、ブドウ球菌、連鎖球菌など)、あるいはグラム陰性病原菌(例えば、コレラ菌、大腸菌、緑膿菌、サルモネラ菌、赤痢菌、髄膜炎菌、淋菌、など)などが挙げられる。本発明のターゲティングDNAを用いて、このような細菌の内在性ゲノムDNAに修飾を施すことにより、細菌を弱毒化あるいは無毒化し、ワクチンを製造することが可能である。

【0054】ウイルスとしては、例えば、レトロウイルス(例えば、マウス白血病ウイルス等のオンコルナウイルス、レンチウイルス、スプーマウイルスなど)、アデノウイルス(例えば、II型、V型など)、アデノ随伴ウイルス、肝炎ウイルス(例えば、A型、B型、C型、非A非B型、D型など)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、ポックスウイルスなどが挙げられる。好ましくは、レトロウイルス(例えば、マウス白血病ウイルス等のオンコルナウイルス、レンチウイルス、スプーマウイルスなど)、アデノウイルス(例えば、II型、V型など)、アデノ随伴ウイルス、肝炎ウイルス(例えば、A型、B型、C型、非A非B型、D型など)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、インフルエンザウイルスである。本発明のターゲティングDNAを用いて、このようなウイルスの内在性ゲノムDNAに修飾を施すことにより、細菌を弱毒化、無毒化、あるいは非増殖性とすることにより、ワクチンを製造することが可能である。とりわけ、レトロウイルス(特に、マウス白血病ウイルス等のオンコルナウイルス)、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルスについては、ウイルスの複製に必要なDNA領域のmRNAへの翻訳を阻害するように修飾することにより、遺伝子治療に汎用されているウイルスベクターを作製することができる。

【0055】本発明における「ターゲティングDNA」とは、相同組換えにより、前記生物の内在性ゲノムDNA中の所望の標的DNA配列を修飾するために用いられるDNA構造体を意味する。ここで当該「DNA構造体」は、各々の末端側に、該標的DNA配列の外側に存在する各々のゲノムDNA配列に相同なDNA配列(相同領域)を有し、該2つの相同領域に挟まれるDNA配

列中に該内在性ゲノムDNAにとって外来である所望の外来性DNAを有するという基本構造からなる。該各々の「相同領域」の塩基長は、該ターゲティングDNAが該内在性ゲノムDNAとハイブリダイズして両者の間で相同組換えが起こすことができる限り、どのような長さであってもよいが、好ましくは約2 kbp (約2,000bp)以上である。しかしながら、当該例示の塩基長は、該相同組換えを高い確率で起こさせるために必要な長さを、単に1,000bpの単位で示しただけである。即ち、当該相同領域の塩基長は数bp乃至数百bpの単位で増減し得る。

【0056】また、標的DNA配列の「修飾」とは、ターゲティングDNAと内在性ゲノムDNAとの相同組換えにより、該内在性ゲノムの一部に導入される下記のようなDNA配列の改変を意味する。

(1) 該標的DNAの一部または全部のDNA配列の欠失。

(2) 該標的DNAの一部または全部のDNA配列の外来性DNAとの置換。

(3) 該標的DNAの一部または全部のDNA配列中への外来性DNAの挿入。

好ましい「修飾」としては、前記(2)の置換を挙げることができる。また当該「置換」としては、当該置換が、該標的DNA配列のmRNAへの転写を不可能たらしめるような置換であることが好ましい。さらに好ましくは、該標的DNA配列のmRNAへの転写を不可能たらしめ、且つ該外来性DNAの発現を可能たらしめるような置換である。

【0057】当該「外来性DNA」としては、所望のいかなるDNAであってもよいが、例えば、マーカー遺伝子、レポーター遺伝子、遺伝子増幅遺伝子、内在性ゲノムDNA中の所望の遺伝子のmRNAへの転写を制御する能力を有する遺伝子発現制御DNA配列、あるいはそれらの1つ以上を含むDNA配列を挙げることができる。該「マーカー遺伝子」としては、遺伝子組換え技術分野において通常使用されるいかなるマーカー遺伝子も用いることができる。例えば、テトラサイクリン、アンピシリン、ネオマイシン、ピューロマイシン、ブラストサイシンまたはカナマイシン等の抗生物質耐性遺伝子等が例示される。好ましくは、ネオマイシン耐性遺伝子である。

【0058】該「遺伝子増幅遺伝子」としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、グルタミン酸合成酵素遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、オルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子、ヒグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、アスパラートトランスカルバミラーゼ遺伝子等を例示することができる。さらに、HPRT(フォスホリボシルオトランスフェラーゼ)遺伝子も使用可能である。

【0059】該「レポーター遺伝子」としては、蛍光若しくはウミシイタケなどに由来するルシフェラーゼ、クラ

ゲ由来のGFP (Green Fluorescence Protein) あるいはβラクタマーゼなどをコードする遺伝子を挙げることができる。該「遺伝子発現制御DNA配列」としては、例えば、遺伝子活性化(ジーンアクチベーション)と称される技術において用いられるようなDNA配列を挙げることができる(国際出願公開公報W091/06667など)。

【0060】本発明における「ノックアウト細胞」及び「ノックアウト動物」とは、例えば、相同組換え用ターゲティングDNAを用いて、内在性ゲノムDNA中の標的DNA配列(例えば、生理活性蛋白をコードする内在性遺伝子)の一部または全部に、前記に定義したような「修飾」が導入される結果、該標的DNA配列のmRNAへの転写が不能である(不活性化されている)細胞及び生物を意味する。

【0061】該「細胞」には、前記に定義した種々の「脊椎動物」の種々の体細胞、生殖細胞(受精卵、精子など)に由来する生細胞または樹立された細胞株が含まれる。さらには、受精卵に含まれる胚性幹細胞(Embryonic stem cell; ES細胞)が包含される。また、植物由来の生細胞または樹立した細胞株も包含される該「動物」としては、前記に定義した種々の脊椎動物、好ましくは非ヒト哺乳動物を挙げることができ、より好ましくはマウスである。

【0062】本発明における「ノックイン細胞」及び「ノックイン動物」とは、例えば相同組換え用ターゲティングDNAを用いて、内在性ゲノム中の標的DNA配列(例えば、生理活性蛋白をコードする内在性遺伝子)の一部または全部に、前記(2)において例示したような外来性DNAとの置換により修飾が導入された結果、該標的DNA配列のmRNAへの転写が阻害される(即ち、標的遺伝子の不活性化、破壊)一方で、該外来性遺伝子を発現する能力を獲得した細胞や動物を意味する。該外来性DNAとしては、前記に例示したような種々のマーカー遺伝子及び/またはレポーター遺伝子を含むDNAを挙げることができる。好ましくはマーカー遺伝子とレポーター遺伝子を共に含むDNAであることが好ましい。好ましい具体的態様の一例としては、ネオマイシン耐性遺伝子等のマーカー遺伝子の5'上流にルシフェラーゼやβラクタマーゼなどのレポーター蛋白をコードする遺伝子を含む外来性DNAを挙げることができる。

【0063】該「ノックイン動物」で言うところの「動物」としては、前記に定義した種々の脊椎動物、好ましくは非ヒト哺乳動物を挙げることができ、より好ましくはマウスである。該「ノックイン細胞」で言うところの「細胞」には、前記に定義した種々の「脊椎動物」の種々の体細胞、生殖細胞(受精卵、精子など)に由来する生細胞または樹立された細胞株が含まれる。さらには、受精卵に含まれる胚性幹細胞(Embryonic stem cell; ES細胞)が包含される。また、植物由来の生細胞または樹立した細胞株も包含される。さらに、前記「ノック

イン動物」に由来する種々の体細胞及び生殖細胞も包含される。

【0064】該ノックアウト細胞やノックアウト動物は、該標的DNA配列（例えば、生理活性蛋白をコードする内在性遺伝子）が不活性化されることにより現れる細胞の形態学的変化、組織学的変化、個体の表現型上の変化、疾患症状の発現の有無、あるいは生存率等の種々の変化を、同一種の正常な細胞あるいは動物のそれらと比較することにより、該不活性化された遺伝子がコードする蛋白の生理学的機能の解明を可能とする。

【0065】一方、ノックイン細胞やノックイン動物は、前述のノックアウト細胞やノックアウト動物において可能となる該不活性化内在性遺伝子の機能解析だけでなく、該標的内在性遺伝子の機能のさらに詳細な解析、並びに該標的内在性遺伝子の発現を調節する薬剤の同定を可能とするものである。即ち、ノックイン細胞やノックイン動物は、該不活性化された標的内在性遺伝子の代わりに、挿入された外来性のルシフェラーゼやβラクタマーゼ等の外来性のレポーター遺伝子を発現するように作製されていることから、該標的内在性遺伝子の機能が不明である場合には、該ノックイン細胞やノックイン動物に医薬上の活性が判明している種々の薬剤や化合物を投与し、該薬剤の投与に依存する該レポーター遺伝子の発現の増減を測定することにより、該標的内在性遺伝子に関わる疾患を推定することが可能となる。また、該内在性遺伝子の機能並びに該遺伝子の疾患との関わりが明らかな場合には、該ノックイン細胞やノックイン動物に種々の化合物を投与することにより、該化合物の投与に依存する該レポーター遺伝子の発現の増減を誘導する活性を有する化合物を同定することができる。そのようにして同定された化合物は該標的内在性遺伝子の発現調節剤として該遺伝子に関わる疾患の治療剤として開発される価値を有する。

【0066】本発明の「組換え非ヒト哺乳動物」とは、前述のノックアウト動物及びノックイン動物に各々包含される、ノックアウト非ヒト哺乳動物及びノックイン非ヒト哺乳動物を意味する。本発明の「組換え細胞」とは、前述したノックアウト細胞またはノックイン細胞を包含する。

【0067】本発明の「ターゲティングDNA」の製造に用いられる所望の生物のゲノムDNA断片は、修飾を施そうとする標的DNA配列の一部または全部を基にDNAプローブまたはPCR用プライマーDNAを作製し、市販または所望に応じて独自に調製したゲノムDNAライブラリー（本発明のゲノムDNAライブラリーを含む）を所望の方法でスクリーニングし、該標的DNA配列を含むゲノムDNA断片を含む陽性クローンを同定することにより得ることができる。ゲノムDNAライブラリーとしては、例えば、ファージライブラリー、BAC（Bacteria Artificial Chromosome）ライブラリーあるいは

YACライブラリー（Yeast Artificial Chromosome）などを用いることができる。好ましくは、BACライブラリーまたはYACライブラリーであり、特に好ましくはBACライブラリーである。また、ゲノムライブラリーとしては、本発明のゲノムDNAライブラリーも極めて有用である。

【0068】ファージライブラリー作製に用いられるファージベクターとしては、例えば、λDASH-II、λFIX-I I、λ2001、EMBL3、EMBL4、Charon4A、Charon21A、Charon32、Charon35、λgt10、λgt11、λZapII、P1ファージ、及びT3ファージなどを挙げることができる。ゲノムDNAライブラリーのスクリーニングは、常法に従って、例えば下記の方法により行うことができる。

（1）該標的DNA配列の一部または全部を含むDNAを放射性同位体で標識したDNAプローブを用いるブランクハイブリダイゼーション法（ブランクハイブリダイゼーション法）（実験医学別冊、「遺伝子工学ハンドブック」、p. 58-64, 1992、羊土社発行などを参照）。

（2）該標的DNA配列を基に設計された一対のプライマーDNAを用いるPCR法と該ブランクハイブリダイゼーションを組み合わせた方法（蛋白質核酸酵素増刊、「ゲノム解析研究」、Vol. 38, No. 3, p. 591-599, 1993、共立出版株式会社発行などを参照）。

（3）該標的DNA配列を基に設計された一対のプライマーDNAを用いるPCR法のみを用いる方法（蛋白質核酸酵素増刊、「ゲノム解析研究」、Vol. 38, No. 3, p. 591-599, 1993、共立出版株式会社発行などを参照）。

（4）パルスフィールドゲル電気泳動とサザンハイブリダイゼーションを用いる方法（蛋白質核酸酵素増刊、「ゲノム解析研究」、Vol. 38, No. 3, p. 591-599, 1993、共立出版株式会社発行などを参照）。所望のゲノムDNAクローンをYACライブラリーまたはBACライブラリーから単離する場合には、前記（2）乃至（3）のいずれかの方法を用いることができる。実験操作の簡便性並びに時間の節減の観点を検討すると、ブランクハイブリダイゼーションやラジオグラフィー等の煩雑な操作を必要としない前記（3）の方法を用いるのが好ましい。

【0069】前記（3）の方法は、48ウェル（48穴）、96ウェル（96穴）あるいは364ウェル（穴）等の多数のウェルを有するマイクロプレートの各ウェルに各々異なるゲノムDNAクローンを一種類ずつ備えられた複多数の該マイクロプレートから構成されるYACライブラリーまたはBACライブラリーをいわゆる三次元PCR（3D-PCR）と呼称される方法を用いてスクリーニングすることの特徴とするものである。

【0070】以下に各々異なるクローンが例えば多数の96穴マイクロプレート（縦8ウェル×横12ウェル）の各ウェルに保存されているBACライブラリーまたはYACライブラリーを想定した場合の3D-PCRによるスクリーニング方法の基本原則を概略する。但し、用いられる市

販のライブラリーによって多少の実験操作の差異があることから、実際のスクリーニングにおいては、該ライブラリーに添付の実験操作マニュアルに従って行うのが好ましい。

①例えば、該96穴マイクロプレート縦5枚×横3枚に隣接して並べ、さらに、各プレートの各々に各々別のプレートを重ね合計47段とする。縦、横及び高さを各々X軸、Y軸及びZ軸とすると、X軸方向には合計40ウェル（8ウェル×5枚、座標：X1乃至X40）、Y軸方向には合計36ウェル（12ウェル×3枚、座標：Y1乃至Y36）、Z軸方向には合計47ウェル（47段、座標：Z1乃至Z47）が存在することとなる。

②Z軸上の座標がZ1である全てのウェルの各クローンサンプルを混合して混合サンプルmZ1を調製する。次いで、Z軸上の座標がZ2である全てのウェルの各クローンサンプルを混合して混合サンプルmZ2を調製する。同様にして、座標Z3乃至Z47の各々について、混合サンプルmZ3乃至mZ47を調製する。

【0071】③X軸上の座標がX1である全てのウェルの各クローンサンプルを混合して混合サンプルmX1を調製する。次いで、X軸上の座標がX2である全てのウェルの各クローンサンプルを混合して混合サンプルmX2を調製する。同様にして、座標X3乃至X40の各々について、混合サンプルmX3乃至mX40を調製する。

④Y軸上の座標がY1である全てのウェルの各クローンサンプルを混合して混合サンプルmY1を調製する。次いで、Y軸上の座標がY2である全てのウェルの各クローンサンプルを混合して混合サンプルmY2を調製する。同様にして、座標Y3乃至Y36の各々について、混合サンプルmY3乃至mY36を調製する。

【0072】⑤修飾を施そうとする標的DNA配列を基に、一対のプライマーDNAを調製する。

⑥前記②乃至④で調製した合計123種類の混合サンプル（即ち、mZ1乃至mZ47、mX1乃至mX40、及びmY1乃至mY36）の各々について、該一対のプライマーDNAを用いて常法によりPCRによるDNA増幅を行う。

⑦PCR産物を電気泳動に供し、DNA増幅が認められる複数の混合サンプルを同定する。

⑧同定された複数の混合サンプルの各々の座標から、該標的DNA配列を含むゲノムDNA断片がクローニングされた陽性クローンが保存されているプレート及びウェルの位置を同定し、目的のゲノムDNAクローンとして回収する。例えば、前記工程⑦で混合サンプルmX1、mY1及びmZ1の各々でDNA増幅が認められた場合には、目的の陽性クローンは座標（X1, Y1, Z1）のウェルに存在することが判明する。

【0073】上述したとおり、ゲノムDNA断片は、本発明のゲノムDNAライブラリーを上述と同様の方法でスクリーニングすることによっても得ることができる。本発明のゲノムDNAライブラリーは、生物（例えば、マウ

ス、ラットまたはヒトなどの哺乳動物、好ましくはマウスまたはヒト）のゲノムDNA断片であって約5乃至12Kbの塩基長を有するゲノムDNA断片を上述のベクター中に挿入してなる多数のクローンからなるゲノムDNAライブラリーである。好ましくは、該クローンの各々をマイクロチューブまたは多数のウェルを有するマイクロプレート中に配備してなるゲノムDNAライブラリーである。ここで、該マイクロチューブの各々、または該マイクロプレートのウェルの各々に配備されるクローンは、単一のクローンであってもよいし、あるいは複数種類のクローンの混合物であってもよい。上述したとおりターゲティングDNAと内在性ゲノムとの間で相同組換えを誘発するためには、ターゲティングDNA中の5'及び3'側に各々含まれる相同領域は、各々少なくとも約2乃至約5Kbの塩基長、両者併せて少なくとも約4乃至約10Kbあるいは約5乃至12Kbの塩基長を必要とされる。

【0074】以下に、本発明のゲノムDNAライブラリーの作製方法をマウスゲノムDNAライブラリーの作製を例にとりて例示する。マウスゲノムDNAは、併せて約 3×10^6 Kbの塩基長を有する。このゲノムDNAを正確に所望の長さ、例えば約10KbのゲノムDNA断片に切断できるならば、約 3×10^5 種類のDNA断片が生ずることとなるが、現実的には不可能である。従って、本発明のゲノムDNAライブラリーの作製に用いられるゲノムDNA断片は、種々の制限酵素を用いておおよそ所望の長さをなすように、該ゲノムDNAを消化することにより調製することができる。ゲノムDNAには、4塩基認識制限酵素により認識される4塩基配列が、確率上 $4^4 (=256)$ 塩基ごと、即ち約250bごとに出現する。従って、4塩基配列認識制限酵素を用いて、ゲノムDNAを種々の部分消化することにより所望の大きさのゲノムDNA断片を調製することができる。また、該4塩基認識制限酵素による部分消化だけでなく、所望により5塩基認識制限酵素及び／または6塩基認識制限酵素による消化も行うことができる。4塩基認識制限酵素としては、Alu I、Hae III、Hha I、Hpa II、Msp I、Nla III、Rsa I、Sau3A I、Taq I及びTspE Iなどが挙げられる。5塩基認識制限酵素としては、Cfr13 I、Dde I、EcoR II、Eco47 I、Hinf I、Mva I、ScrF I及びSau96 Iなどが挙げられる。6塩基認識制限酵素は遺伝子工学の分野で汎用されている多数の制限酵素から所望に応じ選択し使用できる。このようにして作製したゲノムDNA断片の各々を所望のプラスミドやファージ中に挿入して得た多数のクローンの各々を、マイクロチューブまたは多数のウェルを有するマイクロプレート中に配備することによりゲノムDNAライブラリーとする。ここで、該マイクロチューブの各々、または該マイクロプレートのウェルの各々に配備されるクローンは、単一のクローンであってもよいし、あるいは複数種類のクローンの混合物であってもよい。

【0075】本発明で用いられるPCRによる遺伝子増

幅は、既存のDNAポリメラーゼ及び市販のPCR装置を用いて、常法及び試薬に添付の取扱マニュアルにしたがって行うことができる(実験医学・増刊、「PCRとその応用」、第8巻、第9号、1990年；並びに「遺伝子増幅PCR法・基礎と新しい展開」、共立出版株式会社発行、1992年)。また、PCRの条件は、所望に応じて調整することができる。

【0076】本発明における「制限酵素認識DNA配列」とは、遺伝子組換え技術の分野で慣用される任意の制限酵素(制限エンドヌクレアーゼ)により認識されるDNA配列を意味する。以下にその一例を挙げる。下記塩基配列中の斜線は該制限酵素による切断部位を意味する。

制限酵素：EcoRI、認識DNA配列：G/AATTC；
制限酵素：EcoRV、認識DNA配列：GAT/ATC；
制限酵素：HindIII、認識DNA配列：A/AGCTT；
制限酵素：XhoI、認識DNA配列：C/TCGAG；
制限酵素：XbaI、認識DNA配列：T/CTAGA；
制限酵素：BglII、認識DNA配列：A/GATCT；
制限酵素：PstI、認識DNA配列：CTGCA/G；
制限酵素：PvuII、認識DNA配列：CAG/CTG；
制限酵素：BamHI、認識DNA配列：G/GATCC；
制限酵素：ScaI、認識DNA配列：AGT/ACT；
制限酵素：NotI、認識DNA配列：GC/GGCCGC；
制限酵素：PacI、認識DNA配列：TTAAT/TAA。

【0077】本発明における「制限酵素による切断末端DNA配列」とは、例えば、DNAが前記に例示したような制限酵素により認識される特定の塩基配列(例えば、連続する特定の6塩基)で該制限酵素により切断されて生ずる平滑末端(blunt end, flush end)または付着末端(cohesive end, sticky end, staggered end, protruding end, recessive end)を意味する。

【0078】本発明における「リンカーDNA」とは、所望に応じ2つのDNA末端の間に挿入され、該2つのDNA末端を該リンカーDNAを介して連結させるための任意のDNA配列を意味する。該リンカーDNAは、所望に応じどのような塩基配列を有するようにも設計することが可能である。

【0079】本発明の態様に即して、下記に該リンカーDNAの使用法の一例を挙げる。例えば、まず、特定の制限酵素[E]により認識される塩基配列[Y]を内部に有する連続する50塩基からなるリンカーDNAを人工的に合成する。このリンカーDNAを、DNA末端[A]及び[B]を有するDNA[I]と常法により連結させることにより、該DNA末端[A]と[B]の間に該リンカーDNAが挿入された環状DNA[C]を調製することができる。この環状DNAを、該制限酵素[E]で処理することにより、該環状DNAは該制限酵素認識DNA配列[Y]で切断され、制限酵素[E]による切断末端DNA配列を各々の末端に有する線状化DNA[II]が得られる。該リンカーD

NAを挿入することにより生じる効果としては下記が挙げられる。

(1) 該環状DNA[C]に所望の制限酵素認識部位を挿入することができる。

(2) 該DNA[II]の末端に所望の制限酵素切断末端DNA配列を持たせることができる。

(3) 該DNA[II]のDNA末端に、所望の塩基長を有する配列既知の塩基配列を付与することができる。

【0080】本発明の「組換え非ヒト哺乳動物」、即ち、ノックアウト非ヒト哺乳動物及びノックイン非ヒト哺乳動物は、トランスジェニック動物の製造において通常使用されるような常法(例えば、最新動物細胞実験マニュアル、エル・アイ・シー発行、第7章、第361～第408頁、1990年を参照)に従って作製することが可能である。

【0081】本発明で使用する「DNA」なる用語は、ゲノムDNAから調製されるDNA、化学合成によって得られるDNA、mRNAから調製される相補DNA(cDNA)、RNAまたはDNAを鋳型としてPCR法で増幅させて得られるDNA及びこれらの方法を適当に組み合わせて構築される組換えDNAのいずれをも包含する。

【0082】ゲノムDNAからの所望のDNAの調製は、前述したゲノムDNAライブラリーから所望のゲノムDNA断片を選択し、常法に従って所望の制限酵素で切断することにより調製することができる。所望の蛋白をコードするcDNAを調製する方法としては以下の方法が例示される。まず、所望の蛋白を発現・産生する前述のような組織あるいは細胞から該蛋白をコードするmRNAを調製する。mRNAの調製は、例えばグアニンチオシアネート法(Chirgwinら、Biochemistry, Vol. 18, p. 5294, 1979)、熱フェノール法もしくはAGPC法等の公知の方法を用いて調製した全RNAをオリゴ(dT)セルロースやポリU-セファロース等によるアフィニティークロマトグラフィーにかけることによって行うことができる。

【0083】次いで得られたmRNAを鋳型として、例えば逆転写酵素を用いる等の公知の方法、例えばオカヤマらの方法(Mol. Cell. Biol., Vol. 2, p. 161, 1982; 同誌、Vol. 3, p. 280, 1983)やHoffmaらの方法(Gene, Vol. 25, p. 263, 1983)等によりcDNA鎖を合成し、cDNAの二本鎖cDNAへの変換を行う。このcDNAをプラスミドベクターもしくはファージベクターに組み込み、大腸菌を形質転換して、あるいはインビトロパッケージング後、大腸菌に形質移入(トランスフェクト)することによりcDNAライブラリーを作製する。

【0084】ここで用いられるプラスミドベクターとしては、宿主内で複製保持されるものであれば特に制限されず、また用いられるファージベクターとしても宿主内で増殖できるものであれば良い。常法的に用いられるク

ローニング用ベクターとして λ ZipLox、pUC19、 λ gt10、 λ gt11等が例示される。ただし、後述の免疫学的スクリーニングに供する場合は、宿主内で本発明のタンパクをコードする遺伝子を発現させるプロモーターを有したベクターであることが好ましい。プラスミドにcDNAを組み込む方法としては、例えばManiatisらの方法(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, p.1.53, 1989, ColdSpring Harbor Laboratory)に記載の方法などが挙げられる。また、ファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、Hyunhらの方法(DNA Cloning, a practical approach, Vol.1, p.49, 1985)などが挙げられる。簡便には、市販のクローニングキット(例えば、GIBCO製あるいは宝酒造製等)を用いることもできる。このようにして得られる組換えプラスミドやファージベクターは、原核細胞(例えば、E.Coli:JM109、HB101、DH5 α またはMC1061/P3等)等の適当な宿主に導入する。

【0085】プラスミドを宿主に導入する方法としては、(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, p.1.74, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory)に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム/塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、ファージベクターを宿主に導入する方法としてはファージDNAをインビトロパッケージングした後、増殖させた宿主に導入する方法等が例示される。インビトロパッケージングは、市販のインビトロパッケージングキット(例えば、ストラタジーン製、アマシャム製等)を用いることによって簡便に行うことができる。

【0086】目的の蛋白をコードするcDNAは、例えば、別個に調製した該目的の蛋白のアミノ酸配列をコードする塩基配列の一部または全部を含むDNAあるいは該塩基配列と相同性を有するDNAを、 32 Pまたは $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 等の放射性同位体で標識してプローブとなし、公知のコロニーハイブリダイゼーション法(Crunsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.72, p.3961, 1975)またはプライクハイブリダイゼーション法(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Vol.2.108, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory)によりスクリーニングすることにより得ることができる。また、cDNAを発現しうるベクター(例えば、 λ ZipLox、 λ gt11ファージベクター)を用いて作製したcDNAライブラリーを用いる場合には、該目的の蛋白に反応性を有する抗体を用いる抗原抗体反応を利用して、目的のcDNAクローンを選択することができる。大量にクローンを処理する場合には、PCR法を利用したスクリーニング法を用いることが好ましい。

【0087】この様にして得られたDNAの塩基配列は、マキサム・ギルバート法(Maxamら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.74, p.560, 1977)、ファージM

13を用いたジデオキシヌクレオチド合成鎖停止の方法(Sangerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.74, p.5463-5467, 1977)、あるいはダイターミネーターサイクルシーケンシング法(Applied Biosystems社製)などによって決定することができる。

【0088】本発明において所望に応じて用いられる「発現ベクター」は、原核細胞及び/または真核細胞の各種の宿主内で複製保持または自己増殖できるものであれば特に制限されず、プラスミドベクターおよびファージベクターが包含される。例えば、大腸菌由来のプラスミド(pBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pUC19など)、酵母由来プラスミド(pSH19、pSH15など)、枯草菌由来プラスミド(pUB110、pTP5、pC194など)が例示される。また、ファージベクターとしては前述した λ ファージなどの種々のファージ由来のベクターを用いることができる。さらに、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニヤウイルス、核多角体ウイルスなどの動物や昆虫のウイルスを用いることができる。

【0089】細菌、特に大腸菌中で所望の蛋白を発現させる場合には、一般に発現ベクターは、少なくともプロモーター-オペレーター領域、開始コドン、該所望の蛋白をコードするDNA、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位から構成される。宿主として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合、発現ベクターは、少なくともプロモーター、開始コドン、所望の蛋白をコードするDNA、終止コドンを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、該所望の蛋白をコードする遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、選択マーカー遺伝子または複製可能単位などを含んでいてもよい。また、目的に応じて通常用いられる遺伝子増幅遺伝子(マーカー)を含んでいてもよい。

【0090】細菌中で所望の蛋白を発現させるためのプロモーター-オペレーター領域は、プロモーター、オペレーターおよびShine-Dalgarno(SD)配列(例えば、AAGGなど)を含むものである。例えば宿主がエシェリキア属菌の場合、好適にはTrpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーター、tacプロモーターなどを含むものが例示される。酵母中で所望の蛋白を発現させるためのプロモーターとしては、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターが挙げられ、宿主がバチルス属菌の場合は、SL01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが挙げられる。また、宿主が哺乳動物細胞等の真核細胞である場合、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。好ましくは、SV40プロモーター、レトロウイルスのプロモーターであ

る。しかし、特にこれらに限定されるものではない。また、発現にはエンハンサーの利用も効果的な方法である。好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン (ATG) が例示される。終止コドンとしては、常用の終止コドン (例えば、TAG、TGA、TAA) が例示される。

【0091】ターミネーター領域としては、通常用いられる天然または合成のターミネーターを用いることができる。複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能力をもつDNAを言い、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド (天然のプラスミドから調製されたDNAフラグメント) および合成プラスミド等が含まれる。例えば、E. Coliではプラスミド pBR322、もしくはその人工的修飾物 (pBR322を適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント) が、酵母では酵母2 μ プラスミド、もしくは酵母染色体DNAが、また哺乳動物細胞ではプラスミド pRSVneo (ATCC 37198)、プラスミド pSV2dhfr (ATCC 37145)、プラスミド pdBPV-MMTneo (ATCC 37224)、プラスミド pSV2neo (ATCC 37149) 等が例示される。エンハンサー配列、ポリアデニレーション部位およびスプライシング接合部位については、例えばそれぞれSV40に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。選択マーカーとしては、前記に例示した種々の抗生物質耐性遺伝子 (ネオマイシン耐性遺伝子など) や種々の遺伝子増幅遺伝子を用いることができる。

【0092】本発明において所望に応じて用いられる発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、所望の蛋白をコードするDNA、終止コドンおよびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント (例えば、所望のリンカーDNA配列、所望の制限酵素による切断末端DNA配列など) を用いることができる。

【0093】本発明において所望に応じて使用され得る「形質転換細胞」は、上述の種々のDNAまたは発現ベクター等で形質転換された細胞であり、宿主細胞としての原核細胞あるいは真核細胞を形質転換することにより調製することができる。また、本発明のターゲティングDNAで形質転換された細胞 (例えば、哺乳動物のES細胞など) も形質転換細胞と称される。宿主細胞へのDNA、本発明のターゲティングDNA、あるいは発現ベクターの導入 (形質転換 (形質移入)) は従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、細菌 (E. coli、Bacillus subtilis 等) の場合は、例えばCohenらの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 69, p. 2110, 1972)、プロトプラスト法 (Mol. Gen. Genet., Vol. 168, p. 111, 1979) やコンピテント法 (J. Mol. Biol., Vol. 56, p. 209, 1971) によって、Saccharomyces cerevis

iaeの場合は、例えばHinnenらの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 75, p. 1927, 1978) やリチウム法 (J. Bacteriol., Vol. 153, p. 163, 1983) によって、動物細胞の場合は、例えばエレクトロポレーション法やGrahamの方法 (Virology, Vol. 52, p. 456, 1973)、昆虫細胞の場合は、例えばSummersらの方法 (Mol. Cell. Biol., Vol. 3, p. 2156-2165, 1983) によってそれぞれ形質転換することができる。形質転換細胞は、所望の栄養培地中で培養することにより維持生存させることができる。

【0094】栄養培地は、宿主細胞 (形質転換体) の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、パレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素 (例えば、無機塩 (例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム)、ビタミン類、抗生物質 (例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等) など) を含んでいてもよい。培養条件 (例えば温度、培地のpHおよび培養時間) は、培養する細胞の特徴に応じて適宜調整することができる。なお、下記にその一例を示すがこれらに限定されるものではない。

【0095】宿主が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pHが5~8である培地である。宿主がE. coliの場合、好ましい培地としてLB培地、M9培地 (Millerら、Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 431, 1972) 等が例示される。かかる場合、培養は、必要により通気、攪拌しながら、通常14~43℃、約3~24時間行うことができる。

【0096】宿主がBacillus属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常30~40℃、約16~96時間行うことができる。宿主が酵母である場合、培地として、例えばBurkholder最小培地 (Bostian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, p. 4505, 1980) が挙げられ、pHは5~8であることが望ましい。培養は通常約20~35℃で約14~144時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0097】宿主が動物細胞の場合、培地として例えば約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 (Science, Vol. 122, p. 501, 1952)、DMEM培地 (Virology, Vol. 8, p. 396, 1959)、RPMI1640培地 (J. Am. Med. Assoc., Vol. 199, p. 519, 1967)、199培地 (proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol. 73, p. 1, 1950) 等を用いることができる。培地のpHは約6~8であるのが好ましく、培養は通常約30~40℃で約15~72時間行なわれ、必要により通

気や攪拌を行うこともできる。宿主が昆虫細胞の場合、例えば胎児牛血清を含むGrace's 培地 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, p. 8404, 1985) 等が挙げられ、その pH は約 5~8 であるのが好ましい。培養は通常約 20~40℃ で 15~100 時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0098】

【実施例】以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明が該実施例に記載される態様のみに限定されるものではないことは言うまでもない。

【0099】実施例 1 HPRT 遺伝子ノックアウトマウスの作製

<1-1> HPRT 遺伝子を含むマウスゲノム BAC クローンの取得

マウス HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyl transferase) をコードする遺伝子を保持するマウスゲノム DNA 断片を、市販のマウスゲノム DNA の BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ライブラリーである DOWN TO THE WELL MOUSE ES BAC DNA POOL (Genome Systems 社製) を、該ライブラリーに添付の実験操作手順書に記載された 3D-PCR 法に準じた方法に従ってスクリーニングすることにより得た。このライブラリーは、大腸菌に保持された約 92,160 個の BAC クローンの各々が、384 穴マイクロプレートの各ウェルに保存された合計 240 枚のプレートからなり、このライブラリーは Genome Systems 社で保管されている。また、3D-PCR によるスクリーニングを実施するために、該ライブラリーとは別に、該ライブラリー中の BAC クローンの DNA が、種々の規則的組み合わせで混合された混合サンプルのチューブが作製されている。該ライブラリープレートの各ウェルには、各々異なる番号が付されているため、各チューブに混合されている BAC クローンの種類は明白である。該ライブラリーをスクリーニングし、目的の BAC クローンを取得しようとする者は、該種々の BAC クローンの DNA の混合サンプルが保存されているチューブの一式を購入し、実験操作説明書に従って 3D-PCR によるスクリーニングを行い、目的のゲノム DNA 断片がクローニングされている BAC クローンが保存されているウェルの番号を特定する。そのようにして特定された番号のウェルに保存されている BAC クローンを、Genome Systems 社から購入できる。

【0100】マウス HPRT 遺伝子は、8 つのイントロンで分断された 9 つのエクソンから構成され、全体で 33kb にも及ぶ (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 81, p. 2147, 1984)。マウス HPRT 遺伝子のエクソン 3 の塩基配列を基に、各々塩基配列の一部に相補的な一対の PCR プライマー、p3A (配列番号 1) 及び p3B (配列番号 2) を調製した。購入した全ての混合サンプルチューブの各々について、下記条件で PCR 行った。

【0101】(反応混合物組成) 0.5U の Taq ポリメラーゼ、2.5mM の MgCl₂、0.4mM の dNTP、4 μM の p3A、及び 4 μM

の p3B。

(反応サイクル) 94℃ で 3 分の反応を 1 サイクル; 50℃ で 2 分の反応を 1 サイクル; 及び 72℃ で 1 分、94℃ で 1 分及び 50℃ で 1 分の反応を 30 サイクル。得られた PCR 産物を、常法に従ってゲル電気泳動に供し、ゲル上に現れるバンドの大きさから、期待される塩基長を有する DNA の増幅が見られる混合サンプルチューブを同定した。本 PCR による増幅が期待される DNA の塩基長は、197bp である。その結果、各々 64N20、118E2 及び 131H17 という番号が付されたウェル中の BAC クローン中にマウス HPRT 遺伝子を含むゲノム DNA 断片がクローニングされていることが判明した。当該 3 つの BAC クローンを、Genome Systems 社より購入した。

【0102】<1-2> マウスゲノム BAC DNA の制限酵素による切断、及び環状化

Genome Systems 社より購入した BAC クローン 64N20 の DNA を、アルカリを用いて常法に従って精製した (Nucl. Acids Res., Vol. 7, p. 1513-1523, 1979)。7 種の制限酵素 (EcoRI, HindIII, BamHI, XhoI, PstI, PvuI, PvuII 及び XmnI) について、マウス HPRT 遺伝子のゲノム DNA の制限酵素地図が作製されており、EcoRI、HindIII または BamHI で切断すると相同組換え用ターゲティング DNA に必要な相同領域として適した大きさのゲノム DNA 断片が得られるものと予測された (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 81, p. 2147, 1984)。

【0103】精製 BAC DNA (各 2 μg) を、BamHI, HindIII 及び EcoRI の各々で切断した。次いで、生成物 (各 0.5 μg) を、1U の T4 リガーゼを含む Tris-HCl 緩衝液 (840 μl; <組成>: 66mM の Tris-HCl (pH 7.6)、6.6mM の MgCl₂、10mM の Dithiothreitol、66 μM の ATP) 中で 16℃ で一晩保温することにより、分子内連結させ環状化させた (自己環状化)。得られた環状 DNA をエタノール沈殿させ、20 μl の TE 溶液 (10mM の Tris-HCl (pH 7.5)、1mM の EDTA) 中に溶解させた。

【0104】<1-3> 環状 DNA を鋳型とした逆 PCR
前記実施例で調製した環状 DNA (各 1 μl) :

(1) EcoRI で切断後環状化した環状化 DNA ;

(2) HindIII で切断後環状化した環状化 DNA ; 及び

(3) BamHI で切断後環状化した環状化 DNA、の各々を下記 2 組の PCR プライマーの各々の組み合わせを用いた逆 PCR 反応 (inverse PCR ; inside-out PCR) により増幅させた。

A) マウス HPRT 遺伝子のエクソン 2 の塩基配列に相補的な一対のプライマー

pr2-1 (配列番号 3) 及び pr2-2 (配列番号 4)。

B) マウス HPRT 遺伝子のエクソン 3 の塩基配列に相補的な一対のプライマー

pr3-1 (配列番号 5) 及び pr3-2 (配列番号 6)。PCR 産物のクローニングの効率を上げるために、プライマー pr2-1 及び pr3-1 の 5' 末端近傍には、制限酵素 PacI 認識 DNA

配列 (TTAATTAA) を付加した。また、同様にプライマー pr2-2 及び pr3-2 の 5' 末端近傍には、制限酵素 NotI 認識 DNA 配列 (GCGGCCGC) を付加した。

【O 1 0 5】PCR は下記の反応条件で行った。

(反応混合物組成) 0.5U の LA Taq ポリメラーゼ (宝酒造製)、2.5mM の $MgCl_2$ 、0.4mM の dNTP、上記一対のプライマー (各 $4\mu M$)。全量: $50\mu l$ 。

(反応サイクル) $94^{\circ}C$ で 1 分の反応を 1 サイクル; 及び $98^{\circ}C$ で 20 秒及び $68^{\circ}C$ で 10 分の反応を 30 サイクル。得られた PCR 産物を常法に従ってゲル電気泳動に供した。結果を図 1 (分図 1(a)、1(b)、及び 1(c)) に示す。

【O 1 0 6】図 1(a) に示すとおり、前記 (A) に記載の一対のプライマーを用いた PCR で増幅が期待される DNA の大きさは下記のとおりである。

- (1) EcoRI で切断後環状化した環状 DNA: 約 5.5kb (I)
- (2) HindIII で切断後環状化した環状 DNA: 約 4.5kb (II)
- (3) BamHI で切断後環状化した環状 DNA: 約 7.0kb (I II)

図 1(b) に示されるとおり、EcoRI で切断後環状化した環状 DNA 及び HindIII で切断後環状化した環状 DNA においては共に期待される大きさ (各々約 5.5kb 及び約 4.5kb) の DNA の増幅が認められたが、BamHI で切断後環状化した環状 DNA においては期待される大きさの DNA の増幅が認められなかった。

【O 1 0 7】一方、前記 (B) に記載の一対のプライマーを用いた PCR で増幅が期待される DNA の大きさは下記のとおりである。

- (1) EcoRI で切断後環状化した環状 DNA: 約 1.3kb (I V)
- (2) HindIII で切断後環状化した環状 DNA: 約 7.1kb (V)
- (3) BamHI で切断後環状化した環状 DNA: 約 7.0kb (V I)

図 1(c) に示されるとおり、EcoRI で切断後環状化した環状 DNA、HindIII で切断後環状化した環状 DNA、及び BamHI で切断後環状化した環状 DNA の各々においては共に期待される大きさ (各々約 1.3kb、約 7.1kb、及び約 7.0kb) の DNA の増幅が認められた。

【O 1 0 8】<1-4>; HPRT 遺伝子を含むマウスゲノム DNA 断片のクローニング

前記実施例の結果から、BamHI で切断後環状化した環状 DNA を鋳型とした前記 (B) に記載の一対のプライマー DNA を用いた PCR により増幅される PCR 産物を回収することとした。該 PCR 産物を、制限酵素 PacI 及び NotI で切断した後、0.7% アガロースゲル電気泳動に供し、約 7.0kb の大きさを有するバンドを含むゲルを切り出した。該ゲルを、DNA CELL (第一化学社製) を用いた電気溶出に供し、ゲルから、目的の HPRT 遺伝子を含むマウスゲノム DNA

断片を回収した。該 DNA 断片を、T4 リガーゼ (東洋紡製) を用いて、プラスミド p1108 を制限酵素 PacI 及び NotI で切断して調製した線状化プラスミド DNA と連結させ、組換えプラスミド p1207 を作製した (図 2)。該組換えプラスミド p1207 で、大腸菌 JM109 (宝酒造製) を形質転換した。なお、該プラスミド p1108 は、常法に従って、プラスミド pBlueScript (SK+) (Stratagene 製) に、制限酵素処理によりプラスミド pMAMneo-CAT (Stratagene 製) から切り出したネオオシン耐性遺伝子を含む DNA 断片を挿入し、またリンカーを介して制限酵素 PacI 認識 DNA 配列を挿入することにより作製した。該形質転換された大腸菌から、アルカリ法により組換えプラスミド p1207 を回収した。該プラスミドの制限酵素地図を、7 種類の制限酵素 (BamHI, HindIII, EcoRI, PstI, BglII, EcoRV 及び XbaI) について作製した (図 3(a))

【O 1 0 9】<1-5>; ターゲティング DNA の調製
組換えプラスミド p1207 を制限酵素 BamHI で切断した。得られた線状化 DNA を以下の試験で用いるターゲティング DNA として回収した。

【O 1 1 0】<1-6>; ターゲティング DNA の ES 細胞への導入及び相同組換え

GENE Pulser (Bio-Rad 社製) を用いたエレクトロポレーション ($200V$ 、 $360\mu F$ 、 $0.4cm$ gap) により、マウス ES 細胞 (2×10^7 個; Rouxs Arch. Dev. Biol., Vol. 198, p. 48, 1989) に、前記で調製したターゲティング DNA ($100\mu g$) を導入した。該 ES 細胞を、0.1% ゼラチンをコーティングした 15% FBS (牛胎児血清) 含有 DMEM 培地を含むシャーレ (10cm、10枚) に蒔き 24 時間培養した。次いで、培地を $250\mu g/ml$ の G418 を含む選択培地に交換しさらに培養した。7 乃至 10 日間の培養により、350 個の G418 耐性コロニーの生育が観察された。各々のコロニーを回収し、各々個別に、 $250\mu g/ml$ の G418 及び $5\mu g/ml$ の 6-TG (6-Thioguanin) を含む栄養培地中で 10 日間培養した。6-TG は、正常な HPRT 遺伝子を保持する細胞においては、該薬剤が核酸合成系に取り込まれることにより、細胞死に至る。この薬剤を用いることにより、正常な相同組換えにより内在性 HPRT 遺伝子が不活性化された細胞のみを選択することができる。この結果、2 つのクローン (1207-1 及び 1207-2) の生育が認められた。

【O 1 1 1】<1-7>; 正常な相同組換えの確認
ターゲティング DNA と内在性ゲノムとの間での正常な相同組換えによる HPRT 遺伝子の破壊が起こっていることを確認するために、該 2 つの組換え ES 細胞 (1207-1 及び 1207-2) の各々について、染色体サザンハイブリダイゼーションを行った。各々の細胞のゲノム DNA を、既報に従って精製した (Am. J. Hum. Genet., Vol. 36, p. 546, 1984)。該精製ゲノム DNA を、6 種類の制限酵素 (BamHI, HindIII, EcoRI, BglII, EcoRV 及び XbaI) で切断して得られるゲノム DNA 断片 ($5\mu g$) を、0.7% アガロースゲル電気泳動に供し、ナイロンメンブレン (GeneScreen Plus

s、DuponT社製)に転写した。ターゲティングDNAに含まれるアンピシリン耐性遺伝子(Amp)と大腸菌の複製開始点領域(ori)を含むDNA断片を、ランダムプライム法により(α -³²P)dCTPで放射性標識してハイブリダイゼーションプローブとした。ハイブリダイゼーションは、該メンブレンを、プローブ(1×10⁵cpm/ml)を加えたラビッドハイブリダイゼーションバッファー(Amersham製)中で65℃で2時間保温することにより行った。次いで、メンブレンを、2×SSC(standard saline citrate; 0.15 M NaCl, 0.015 M Na-Citrate)/0.1% SDSで15分間、同緩衝液で室温で2回、及び0.2×SSC/0.1% SDSで65℃で2回洗浄した。次いで、メンブレンを、-80℃で一晩、X線フィルム(XAR-5、Kodak製)に感光させた後、現像した(図3(b)及び3(c))。

【0112】正常な相同組換えによるジーンタゲティングが起こっていれば、本サザンハイブリダイゼーションで観察が期待されるDNAの大きさは下記のとおりである(図3(a))。

- (1) BamHIで切断したゲノムDNA断片: 約12.5kb
- (2) BglIIIで切断したゲノムDNA断片: 約8.6kb
- (3) EcoRIで切断したゲノムDNA断片: 約6.8kb
- (4) EcoRVで切断したゲノムDNA断片: 約12.0kb
- (5) HindIIIで切断したゲノムDNA断片: 約12.6kb
- (6) XbaIで切断したゲノムDNA断片: 約7.8kb

図3(b)及び3(c)に示されるとおり、2つのいずれの組換えES細胞においても期待される大きさのDNAのバンドが検出された。この結果から、本実施例で作製された相同組換え用ターゲティングDNAが、内在性ゲノムとの正常な相同組換えにより、マウスES細胞中の内在性HPRT遺伝子を破壊したことが確認された。また、本発明の方法による相同組換えの頻度は、約0.6%であり、従来の方法により作製されるターゲティングDNAによる相同組換えの平均的値と同等であった。

【0113】実施例2 EPO受容体遺伝子ノックアウトマウスの作製

<2-1> EPO受容体遺伝子を含むマウスゲノムBACクロンの取得

マウスEPO受容体(Erythropietin receptor; Cell, Vol. 57, p. 277, 1989; J. Mol. Biol., Vol. 216, p. 567, 1990; Mol. Cel. Biol., Vol. 10, p. 3675, 1990)をコードする遺伝子を保持するマウスゲノムDNA断片を、実施例<1-1>と同様にして市販のマウスゲノムDNAのBACライブラリーであるDOWN TO THE WELL MOUSEES BAC DNA POOL (Genome Systems社製)をスクリーニングすることにより得た。マウスEPO受容体遺伝子のエクソン2の塩基配列を基に、各々塩基配列の一部に相補的な一対のPCRプライマー、EpoR11(配列番号7)及びEpoR21(配列番号8)を調製した。購入した全ての混合サンプルチューブの各々について、下記条件でPCRを行った。

【0114】(反応混合物組成) 1 UのTaqポリメラー

ゼ、1.5mMのMgCl₂、0.25mMのdNTP、0.4μMのEpoR11、及び0.4μMのEpoR21。

(反応サイクル) 92℃で3分の反応を1サイクル; 92℃で30秒、55℃で30秒及び72℃で1分の反応を30サイクル; 及び、72℃で5分。得られたPCR産物を、常法に従ってゲル電気泳動に供し、ゲル上に現れるバンドの大きさから、期待される塩基長を有するDNAの増幅が見られる混合サンプルチューブを同定した。本PCRによる増幅が期待されるDNAの塩基長は、112bpである。その結果、174M2という番号が付されたウェル中のBACクローン中にマウスEPO受容体遺伝子を含むゲノムDNA断片がクローニングされていることが判明した。当該BACクローンを、Genome Systems社より購入した。

【0115】<2-2>; マウスゲノムBAC DNAの制限酵素による切断、及び環状化

Genome Systems社より購入したBACクローン174M2を、標準的なアルカリ法により精製した(Nucl. Acids Res., Vol. 7, p. 1513-1523, 1979)。パルスフィールドゲル電気泳動にて、該BACクローンには約120kbのDNAが挿入されていることを確認した。マウスEPO受容体遺伝子のゲノムDNAの制限酵素地図が作製されており、制限酵素BamHI、EcoRV、EcoRI、HindIII、XbaI、XhoI、ScaI、PvuII、PstIまたはBglIIIで切断すると相同組換え用ターゲティングDNAに必要な相同領域として適した大きさのゲノムDNA断片が得られるものと予測された(Mol. Cel. Biol., Vol. 10, p. 3675, 1990)。精製BAC DNA (2μg)を、上記10種類の制限酵素の各々で切断し、フェノール・クロロホルム抽出並びにエタノール沈殿の操作の後、DNAを15μlのTE溶液(10mMのTris-HCl(pH7.5)、1mMのEDTA)に溶解した。次いで、生成物(0.2μl)を、1UのT4リガーゼを含むTris-HCl緩衝液(810μlまたは270μl; <組成>; 66mMのTris-HCl(pH7.6)、6.6mMのMgCl₂、10mMのDithiothreitol、66μMのATP)中で16℃で一晩保温することにより、分子内連結させ環状化させた(自己環状化)。得られた環状DNAをエタノール沈殿させ、20μlのTE溶液(10mMのTris-HCl(pH7.5)、1mMのEDTA)中に溶解させた。

【0116】<2-3>; 環状DNAを鋳型とした逆PCR

前記実施例で調製した環状DNA(各1μl):

- (1) BamHIで切断後環状化した環状化DNA;
- (2) EcoRVで切断後環状化した環状化DNA;
- (3) EcoRIで切断後環状化した環状化DNA;
- (4) HindIIIで切断後環状化した環状化DNA;
- (5) XbaIで切断後環状化した環状化DNA;
- (6) XhoIで切断後環状化した環状化DNA;
- (7) ScaIで切断後環状化した環状化DNA;
- (8) PvuIIで切断後環状化した環状化DNA;
- (9) PstIで切断後環状化した環状化DNA; 及び
- (10) BglIIIで切断後環状化した環状化DNA、の各々をマウスEPO受容体遺伝子のエクソン1の塩基配列に相補的

な一対のプライマーEpoR14（配列番号9）及びEpoR24（配列番号10）を用いた逆PCR反応（inverse PCR；inside-out PCR）により増幅させた。PCR産物のクローニングの効率を上げるために、プライマーEpoR14の5'末端近傍には、制限酵素PacI認識DNA配列（TTAATTAA）を付加した。また、同様にプライマーEpoR24の5'末端近傍には、制限酵素NotI認識DNA配列（GCGGCCGC）を付加した。

【0117】PCRは下記の反応条件で行った。

（反応混合物組成）0.5UのLA Taqポリメラーゼ（宝酒造製）、2.5mMのMgCl₂、0.4mMのdNTP、上記一対のプライマー（各4μM）。全量：50μl。

（反応サイクル）94℃で1分の反応を1サイクル；94℃で20秒及び66℃で15分の反応を14サイクル；及び94℃で20秒及び66℃で15分（1サイクル毎に15秒の増加）の反応を16サイクル得られたPCR産物を常法に従ってゲル電気泳動に供した。結果を図4に示す。図4に示されるとおり、XhoIで切断後環状化した環状DNAにおいて約8kbのDNAの増幅が認められた。さらに、該約8kbのバンドを含むゲルからDNAを抽出し、得られたDNAをさらにXhoIで切断して、ゲル電気泳動に供したところ、約7kbと約1kbの2つのバンドが現れた。

【0118】<2-4>； EPO受容体遺伝子を含むマウスゲノムDNA断片のクローニング

前記実施例の結果から、XhoIで切断後環状化した環状DNAを鋳型としたPCRにより増幅されるPCR産物を回収することとした。該PCR産物を、制限酵素PacI及びNotIで切断した後、0.7%アガロースゲル電気泳動に供し、約8.0kbの大きさを有するバンドを含むゲルを切り出した。該ゲルを、DNA CELL（第一化学社製）を用いた電気溶出に供し、ゲルから、目的のEPO受容体遺伝子を含むマウスゲノムDNA断片を回収した。

【0119】該DNA断片を、T4リガーゼを用いて、プラスミドp1108-Lucを制限酵素PacI及びNotIで切断して調製した線状プラスミドDNAと連結させ、組換えプラスミドpEpoRK/Iを作製した（図5）。該組換えプラスミドpEpoRK/Iで、大腸菌JM109（宝酒造製）を形質転換した。該プラスミドp1108-Lucは、前述のプラスミドp1108（実施例<1-4>）を制限酵素SacIで切断し、該切断部位に、プラスミドpGL3-Basic（Promega製）から制限酵素BamHI及びHindIIIで切り出したルシフェラーゼ遺伝子を含むDNA断片を挿入することにより作製した（図6）。該形質転換された大腸菌から、QUIAGEN Plasmid Maxi Kit（QUIAGEN製）を用いて組換えプラスミドpEpoRK/Iを回収した。

【0120】<2-5>； ターゲティングDNAの調製
組換えプラスミドpEpoRK/Iを制限酵素XhoIで切断した。得られた線状化DNAを以下の試験で用いるターゲティングDNAとして回収した。

【0121】<2-6>； ターゲティングDNAのES細胞

への導入及び相同組換え

GENE Pulser（Bio-Rad社製）を用いたエレクトロポレーション（250V、960μF、0.4cm gap）により、マウスES細胞（6.4×10⁷個；Roux Arch. Dev. Biol., Vol. 198, p. 48, 1989）に、前記で調製したターゲティングDNA（80μg）を導入した。該ES細胞を、マイトマイシン処理したネオマイシン耐性フィーダー細胞を蒔いてあるシャーレ（15%牛胎児血清含有D-MEM培地、10cm、10枚）に蒔き24時間培養した。次いで、培地を250μg/mlのG418を含む選択培地に交換しさらに培養した。10日間の培養により、204個のG418耐性コロニーの生育が観察された。各々のコロニーを回収し、各々個別に、D-MEM培地（15%牛胎児血清含有）中でさらに5日間培養した。

【0122】一部のクローンは、ゲノムDNA回収用として別の96穴マイクロプレート（0.1%ゼラチン溶液で10分間処理済み）に移しさらに3日間培養した。該96穴マイクロプレートから培地を除去し、プレートをリン酸緩衝液で洗浄した。各ウェルにDNAzol（100μl；GIBCO製）を加え十分にピペッティングした。各ウェル中のDNAサンプルの各々を、0.2ml容量のPCR用マイクロチューブに移し、エタノール（50μl）を加え、室温下で5分間静置した。次いで、各チューブを遠心分離（3,000rpm、30分間）にかけ、ペレットを回収した。各ペレットを、95%エタノールで2回洗浄した後、8mMのNaOH（50μl）に溶解した。このゲノムDNAサンプルを、後述のPCRによるスクリーニングでの鋳型として用いた。

【0123】<1-7>； 正常な相同組換えが起こった細胞の選別

ターゲティングDNAと内在性ゲノムとの間での正常な相同組換えによるEPO受容体遺伝子の破壊が起こっている細胞をPCRにより選別するために、下記の一対のプライマーを調製した（図7）。

（1）ターゲティングDNA中に含まれるネオマイシン耐性遺伝子の一部に相補的なプライマー：neo24（配列番号11）。

（2）該ターゲティングDNAが正常な相同組換えにより内在性ゲノムに組み込まれた場合の該ターゲティングDNAの末端のさらに外側の内在性ゲノムの一部の塩基配列に相補的なプライマー：EpoR27（配列番号12）。該プライマーを用いたPCRにより増幅が期待されるDNAの大きさは、1,357bpである。各々の組換えES細胞クローンについて、下記条件でPCRを行った。

【0124】（反応混合物組成）1UのTaqポリメラーゼ、1.5mMのMgCl₂、0.25mMのdNTP、上記一対のプライマー（各0.4μM）。全量：25μl。

（反応サイクル）94℃で5分の反応を1サイクル；94℃で30秒、55℃で30秒、及び72℃で3分の反応を35サイクル；及び72℃で10分を1サイクル。得られたPCR産物を常法に従ってゲル電気泳動に供した。その結果204クローン中、1つのES細胞クローン（No. 20）で、期待される

1, 357bpの大きさのバンドが認められた。

【0125】<2-8>; 正常な相同組換えの確認
該組換えES細胞 (No. 20) について、染色体サザンハイブリダイゼーションを行った。なお、対照としてターゲティングDNAを導入していない野生型ES細胞を用いた。各々の細胞のゲノムDNAを、既報に従って精製した (Am. J. Hum. Genet., Vol. 36, p. 546, 1984)。該精製ゲノムDNAを、5種類の制限酵素 (BamHI、BglIII、HindIII及びPvuII) で切断して得られるゲノムDNA断片 (10 µg) を、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、アルカリ (0.25MのHCl及び0.4MのNaOH) で処理した後、Hybond N⁺ membrane (Amersham社製) に転写した。ハイブリダイゼーションプローブ作製のために、該ターゲティングDNAのDNA配列を基に設計した一対のプライマーEpoR16 (配列番号13) 及びEpoR28 (配列番号14) を用いて該ターゲティングDNAを鋳型としてPCRを行った。該PCRにより得られた約1kbpのDNA断片をランダムプライム法より (α -³²P)dCTPで放射性標識してハイブリダイゼーションプローブとした。

【0126】ハイブリダイゼーションは、該メンブレンを、プローブ (0.5ng/ml) を加えたハイブリダイゼーションバッファー (6×SSC、5×Denhardt溶液、0.5%SDS、100 µg/mlのSalmon sperm DNA) 中で65℃で一晩保温することにより行った。なお、プレハイブリダイゼーションは、同バッファー中で65℃で2時間行った。次いで、メンブレンを、65℃で、2×SSC (standard saline citrate; 0.15M NaCl, 0.015M Na-Citrate) /0.1%SDSで20分、1×SSC/0.1%SDSで20分、及び0.1×SSC/0.1%SDSで20分の操作で各々2回づつ洗浄した。次いで、メンブレンを、Imaging plate (富士写真フイルム社製) に露出させた。解析はBAS2000 (富士写真フイルム社製) で行った。結果を図8に示す。組換えES細胞 (No. 20) で正常な相同組換えによるジーンタゲティングが起こっていれば、本サザンハイブリダイゼーションで観察が期待されるDNAの大きさは下記のとおりである (図8 (a))。

- (1) BamHIで切断したゲノムDNA断片: 約7.2kb
- (2) BglIIIで切断したゲノムDNA断片: 約3.0kb
- (3) HindIIIで切断したゲノムDNA断片: 約11.8kb
- (4) PvuIIで切断したゲノムDNA断片: 約4.2kb

野生型ES細胞の場合には、下記とおりである。

- (1) BamHIで切断したゲノムDNA断片: 約3.5kb
- (2) BglIIIで切断したゲノムDNA断片: 約3.5kb
- (3) HindIIIで切断したゲノムDNA断片: 約4.3kb
- (4) PvuIIで切断したゲノムDNA断片: 約3.8kb

図8 (b)に示されるとおり、組換えES細胞 (No. 20) においては、いずれの制限酵素で切断した場合にも期待される大きさのDNAのバンドが検出された。この結果から、本実施例で作製された相同組換え用ターゲティングDNAが、内在性ゲノムとの正常な相同組換えにより、マウスES細胞中の内在性EPO受容体遺伝子を破壊したことが確

認された。

【0127】<2-9>; 正常な相同組換えが起こった細胞の選別

ターゲティングDNAと内在性ゲノムとの間での正常な相同組換えによるEPO受容体遺伝子の破壊が起こっている細胞をPCRにより選別方法を、前記実施例<2-7>に記載した。下記に示す選別方法は、下記の実験的事実に着目した別の有用な選別方法である。ターゲティングDNAが正しい相同組換えにより標的DNA配列中に組み込まれた場合には、該ターゲティングDNAは末端配列を欠落することなく組み込まれている。しかしながら、ランダムインテグレーション (random integration) のように、ターゲティングDNAが、標的DNA配列以外の部位あるいは誤った形で内在性ゲノムDNAに組み込まれた場合には、組み込まれたターゲティングDNAは、かなり高い確率でその末端配列を欠落している。従って、組換え細胞の内在性ゲノムDNA中に組み込まれたターゲティングDNAの末端配列の有無をPCRにより解析することにより極めて高い精度で正常な相同組換えが起こった組換え細胞の選別が可能である。本方法による選別の結果を下記に示す。

【0128】下記の一対のPCR用プライマーを調製した。

(1) ターゲティングDNA中に含まれるネオマイシン耐性遺伝子の一部に相補的なプライマー: neo24 (配列番号11)。

(2) 該ターゲティングDNAの一方の末端配列 (XhoIによる切断末端DNA配列を含む) に相補的なプライマー: EpoR21 (配列番号8)。該プライマーを用いたPCRにより増幅が期待されるDNAの大きさは、1,146bpである。各々の組換えES細胞クローン (実施例<2-6>) について、下記条件でPCRを行った。

【0129】(反応混合物組成) 0.5UのTaqポリメラーゼ、0.25mMのdNTP、上記一対のプライマー (各0.4 µM)。全量: 25 µl。

(反応サイクル) 95℃で2分の反応を1サイクル; 95℃で30秒、55℃で30秒、及び72℃で2分の反応を35サイクル; 及び72℃で10分を1サイクル。得られたPCR産物を常法に従ってゲル電気泳動に供した。その結果192クローン中、28個のES細胞クローンで、期待される1,146bpの大きさのバンドが認められた。ターゲティングDNAの片方の末端配列を保持するクローンは、約14%であった。前記(2)に記載のプライマーEpoR-21の代わりに該ターゲティングDNAのもう一方の末端配列に相補的なプライマーを用いて上記と同様にPCRを行った場合にも、同様の陽性率になることが予想される。従って、内在性ゲノムに組み込まれた該ターゲティングDNAが、導入されたターゲティングDNAの両方の末端配列を有することをPCRで確認することにより、正常な相同組換えが起こった細胞を約100倍 (0.14×0.14=約0.02、即ち2%) に濃縮

可能である。

【0130】<2-10>; EPO受容体ノックインマウスの作製

実施例<2-8>;で得た内在性EPO受容体遺伝子がされたES細胞（ノックアウトES細胞）を、C57BL/6マウス（チャールズリバー製）の雄雌を交配して得た胚盤胞に1胚あたり10乃至15個ずつ注入（マイクロインジェクション）した。注入直後に、偽妊娠処理してから3.5日目の仮親ICRマウス（19匹；チャールズリバー製）の子宮に子宮の片側あたり約10個ずつの胚盤胞を移植した。その結果、合計40匹の産児を得、その内の25匹が目的のキメラマウスであった。毛色への貢献度が70%以上のキメラマウスは、18匹であった。次いで得られたキメラマウス（雄）を正常C57BL/6マウス（雌）と交配し、ES細胞由来の毛色遺伝子によるアグーチ（agouti）色のマウス（一対の染色体内の一方の染色体上のEPO受容体遺伝子が破壊されたヘテロノックアウトマウス）を得た。得られた雌雄のヘテロマウスを交配し、一対の染色体の両方に存在するEPO受容体遺伝子が破壊されたホモノックアウトマウスを得た。

【0131】実施例3 GN遺伝子ノックアウトマウスの作製

<3-1>; マウスゲノムDNAライブラリーの作製

実施例<1-1>;及び実施例<2-1>;と同様に、マウスGN蛋白（cDNA：配列番号15；アミノ酸配列：配列番号16）をコードする遺伝子を保持するマウスゲノムDNA断片を、市販のマウスゲノムDNAのBACライブラリーであるDOWN TO THE WELL MOUSE ES BAC DNA POOL（Genome Systems社製）をスクリーニングすることにより得た。該マウスGN蛋白をコードするの塩基配列を基に作製した該塩基配列の一部に相補的な一対のPCRプライマーを用いて、全ての混合サンプルチューブの各々について実施例<1-1>;及び実施例<2-1>;と同様の条件でPCRを行った。得られたPCR産物を、常法に従ってゲル電気泳動に供し、ゲル上

に現れるバンドの大きさから、期待される塩基長を有するDNAの増幅が見られる混合サンプルチューブを同定した。その結果、221H03、231G13、及び41D14という番号が付されたウェル中の3つのBACクローン中にマウスGN遺伝子を含むゲノムDNA断片がクローニングされていることが判明した。当該BACクローンを、Genome Systems社より購入した。

【0132】Genome Systems社より購入した3つのBACクローン（221H03、231G13、及び41D14）を、4塩基認識制限酵素HaeIII、AluI及びRsaIの各々で部分消化してマウスゲノムDNA断片を調製した。該ゲノムDNA断片を、アガロースゲル電気泳動に供して、約6乃至8Kbの塩基長を有する複数のゲノムDNA断片を回収した。該ゲノムDNA断片の各々を、制限酵素EcoRVで処理して線状化したプラスミドp1511-1とT4リガーゼを用いて連結した。得られたマウスゲノムDNA断片挿入プラスミドp1511-1の各々で大腸菌JM109を形質転換し、アガロースプレートに蒔きコロニーを形成させた。各々のクローンを96穴マイクロプレート（2枚）の各ウェルに移して、マウスゲノムDNAライブラリーとした。

【0133】<3-2>; マウスGN遺伝子を含むプラスミドクローンの同定、選別

実施例<1-1>;及び実施例<2-1>;の方法と同様にして、前記実施例で調製したマウスゲノムDNAライブラリーである各々のウェルにセットされた各々の環状DNA（プラスミドマウスゲノムDNA）を、マウスGN遺伝子の塩基配列に相補的な一対のプライマーNY-C-F2（フォワードプライマー：配列番号17）及びNY-S-R4（リバースプライマー：配列番号18）を用いたPCR反応（通常の内向きのPCR）により増幅させた。得られたPCR産物を常法に従ってゲル電気泳動に供した。その結果、マウスGN遺伝子を含むマウスゲノムDNAを保持するクローンとして下記10個のクローンが選別された（図17）。

| <クローン名> | | <BACの由来> | <4塩基認識制限酵素> |
|-----------|--------|----------|-------------|
| (1)p1561 | 231G13 | AluI | |
| (2)p1562 | 231G13 | RsaI | |
| (3)p1563 | 231G13 | HaeIII | |
| (4)p1564 | 231G13 | HaeIII | |
| (5)p1565 | 221H03 | HaeIII | |
| (6)p1566 | 221H03 | RsaI | |
| (7)p1567 | 221H03 | AluI | |
| (8)p1568 | 41D14 | AluI | |
| (9)p1569 | 41D14 | AluI | |
| (10)p1570 | 41D14 | AluI | |

【0134】<3-3>; 環状プラスミドマウスゲノムDNAを鋳型とした逆PCR

前記で選別されたマウスGN遺伝子を含むマウスゲノムDNAを保持する環状プラスミドDNAの各々を鋳型として、マウスGN遺伝子の塩基配列に相補的な一対のプライマーNY

-5'-PF3（フォワードプライマー：配列番号19）及びNY-5'-PR3（リバースプライマー：配列番号20）を用いた逆PCR反応（Inverse PCR; Inverted PCR; inside-out PCR）により増幅させた。なお、PCR産物のクローニングの効率を上げるために、上記各々のプライマーの5'末端

側近傍には制限酵素PacI認識DNA配列 (TTAATTA) を付加した。また、PCRは下記の反応条件で行った。

(反応混合物組成) 2.5UのLA Taqポリメラーゼ (宝酒造製)、400 μ M-15 μ MのdNTP、上記一対のプライマー (各15mM)、X2GC緩衝液。

(反応サイクル) 95℃で1分、95℃で30秒及び65℃で10分の反応を5サイクル。得られた各々のPCR産物を制限酵素PacIで処理した後、常法に従ってゲル電気泳動で分離し、各々のDNA断片を回収した。

【0135】<3-4>; DNA断片の大腸菌内での増幅
前記実施例で回収した各々のDNA断片 (マウスGN遺伝子を含むマウスゲノムDNAを保持する各々の線状化プラスミドDNA) を、T4リガーゼを用いて自己環状化 (分子内連結) した後、該各々のDNA断片により大腸菌JM109を形質転換した後、アガロースプレートに蒔いて培養しコロニーを形成させた。生育した各々のコロニーから各々のプラスミドDNAを回収した。各々のプラスミドDNAを制限酵素 (KpnI、SalI、XhoI、PvuI) で消化した後常法に従って電気泳動に供して制限酵素地図を作製した。実施例<3-2>;得た10種類のDNA断片の内の6種類のDNA断片 (p1571, p1572, p1573, p1574, p1575, p1576) に由来するプラスミドDNA (各々p1561, p1562, p1564, p1565, p1566, p1568と命名) についての結果を、図18に示す。

【0136】<3-5>; プラスミドDNAへの外来性遺伝子の挿入

前記で得た6種類のプラスミドDNAの各々を制限酵素PacIで切断した後BAP処理した線状化プラスミドDNAの各々に、ルシフェラーゼ遺伝子及びネオマイシン耐性遺伝子を有するDNAカセットをT4リガーゼを用いて連結し再環状化しプラスミドDNAを調製した。該各々のプラスミドで大腸菌JM109を形質転換し、アガロースプレートに蒔きコロニーを形成させた。生育した各々のコロニーから各々のプラスミドDNAを回収した。各々のプラスミドDNAを制限酵素 (SpeI, EcoRI, MluI) またはRNaseで消化した後常法に従って電気泳動に供して制限酵素地図を作製した。実施例<3-4>;得た10種類のプラスミドDNAの内の4種類のDNA断片 (p1572, p1574, p1575, p1576) に由来するプラスミドDNA (各々p1577, p1578, p1580, p1579と命名) についての結果を、図19に示す。各々のプラスミドDNA (p1577, p1578, p1580, p1579) をベクターDNA中の制限酵素部位 (プラスミドp1511-1中の制限酵素部位) で切断して線状化することによりマウスGN遺伝子のターゲティングDNAを得た。このターゲティングDNAを、以下の試験で用いるマウスGN遺伝子のターゲティングDNAとして用いた。

【0137】実施例4 マウスHE4全長をコードするcDNAの単離

ヒトのHE4タンパク (Human epididymis-specific protein; Biol. Reprod., Vol. 45, No. 2, p. 350-357, 1991) のホモログと推定される新規なマウスHE4タンパクの全

長をコードするcDNAを単離し、その塩基配列及びアミノ酸配列を決定した。ヒトHE4タンパクをコードするDNAの塩基配列の相同性を有するマウスEST (expressed sequence tag) を得た (配列番号21)。市販のマウス腎臓cDNAライブラリー (TaKaRa製) に含まれるcDNAクローンを原料として、1つのウェルにつき約5,000種類のcDNAクローンを48穴マイクロプレートの各々のウェルにセットして新たなマウス腎臓cDNAライブラリーを作製した。このcDNAライブラリーの各々のウェルにセットされたcDNAクローンを鋳型として、前記のマウスESTの塩基配列に相補的な一対のプライマーHE4-F2 (フォワードプライマー: 配列番号22) 及びHE4-R2 (リバースプライマー: 配列番号23) を用いた逆PCR反応 (Inverse PCR; Inverted PCR; inside-out PCR) により遺伝子増幅を行った。

【0138】PCRは下記の反応条件で行った。

(反応混合物組成) 2.5UのLA Taqポリメラーゼ (宝酒造製)、0.4mMのdNTP、上記一対のプライマー (各50mM)、X2GC緩衝液。

(反応サイクル) 95℃で1分、95℃で30秒及び65℃で12分の反応を16サイクル; 95℃で30秒、65℃で12分 (1サイクル毎に15秒の増加) の反応を13サイクル; 及び、72℃で10分の反応を1サイクル。得られた各々のPCR産物を常法に従ってゲル電気泳動に供した。その結果、複数のウェルのcDNAクローンで約6KbのDNAの増幅が認められた (図20)。特に顕著な遺伝子増幅が認められた3つのクローン (A1、C5及びD5) のPCR産物を回収し、S-400スピニングカラムを用いて精製した後、各々のcDNAクローンの塩基配列を決定し、マウスHE4の全長をコードするcDNA (ORFを含む) を得た (cDNA配列: 配列番号24、アミノ酸配列: 配列番号25)。

【0139】

【発明の効果】本発明は、種々生物 (マウス等の非ヒト哺乳動物、植物、細菌またはウイルスなど) の内在性ゲノム中の標的DNA配列 (例えば、特定の蛋白をコードする遺伝子など) を相同組換えにより修飾 (置換、欠失あるいは挿入など) に用いられるターゲティングDNAの新規且つ有用な製造方法、該製造方法を用いて作製されるターゲティングDNA、該ターゲティングDNAを用いることを特徴とする組換え細胞 (ノックアウト細胞あるいはノックイン細胞など)、該ターゲティングDNAを用いることを特徴とする組換え生物 (ノックアウトマウスやノックインマウスに代表されるような組換え非ヒト哺乳動物、組換え細菌及び組換えウイルスなど) の製造方法、該ターゲティングDNAの製造において有用なゲノムDNAライブラリー、並びにcDNAライブラリーから所望のcDNAを保持するクローンを同定し取得する方法 (スクリーニング方法) に関する。

【0140】本発明のターゲティングDNAの製造方法を用いれば、従来のターゲティングDNAの製造方法が有し

ていた前述のような種々の問題点を改善し、相同組換え用ターゲティングDNAの作製に必要な時間及び労力を大幅に低減することが可能であり、極めて簡便にターゲティングDNAを作製することができる。またその結果として、ターゲティングベクターの製造に必要なコストを大幅に低減することができる。即ち、本発明の方法を用いれば、下記のような簡便性を有する結果、従来法によるターゲティングDNAの製造に要していた約3ヶ月という製造期間を最短で約2週間に短縮することが可能である。:

(1) 標的DNA配列を含む内在性ゲノムDNA断片の取得に、時間と労力を要するブランクハイブリダイゼーション法を行う必要がない。

(2) ブランクハイブリダイゼーションの実施に必須である放射性物質とRI (放射性同位体) 管理施設等の特殊な試薬及び施設の使用を必要としない。

(3) 多大な時間と労力を必要とする内在性ゲノムDNA断片の制限酵素地図の作成を行う必要がない。

【0141】また、本発明の方法を用いれば、その簡便性により、一人で複数種類のターゲティングDNAの製造を同時に行うことが可能である。前記期間の短縮の効果との相加効果により、本発明の製造方法を用いれば、一種類のターゲティングベクターの製造のための期間を、最短で約1週間に短縮できる。また、この製造期間の飛躍的な短縮により、ターゲティングベクターの製造に要するコストを大幅に低減することが可能となる。

【0142】さらに、従来法においてはブランクハイブリダイゼーション用のプローブの作製のために200bp以上の塩基配列が既知である必要であったが、本発明の製造方法においては、標的DNA配列の一部に相補的な2種類のPCR用プライマーDNAを設計することが可能な最低約70bpの塩基配列が決定されていれば十分であることから、従来法では不可能であった塩基長が200bpに満たないESTのような短いDNA配列を標的としたターゲティングDNAの製造が可能である。本発明の他の

一つは、ターゲティングDNAと内在性ゲノムDNAとの相同組換えにより該内在性ゲノムDNA中の標的DNA配列が修飾された組換え細胞または組換え生物の新規且つ有用な選別方法である。

【0143】本発明の選別方法を用いれば、煩雑な操作を労力を要するサザンハイブリダイゼーションによる選別を行う必要がなく、ターゲティングDNAと内在性ゲノムDNAとの相同組換えにより該内在性ゲノムDNA中の標的DNA配列が修飾された該組換え細胞または組換え生物の選別を極めて簡便に且つ極めて高い精度で選別することが可能である。

【0144】上述した本発明のターゲティングDNAの製造方法並びに組換え細胞の選別方法を用いれば、医薬品の研究開発のツールとして極めて有用なモデル動物であるノックアウトマウスやノックインマウスなどのトランスジェニック非ヒト哺乳動物の製造に要する期間、労力及びコストを大幅に低減することが可能である。また、同様に、遺伝子治療分野において使用される治療用生理活性蛋白をコードする遺伝子等の運搬体としての組換えベクター (レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなど) の製造に要する期間、労力及びコストを大幅に低減することが可能である。

【0145】また、本発明のゲノムDNAライブラリーを用いることにより、前述のようなターゲティングDNAの作製において必須なゲノムDNA断片を極めて容易且つ短時間で所得することが可能である。

【0146】また本発明のcDNAのスクリーニング方法を用いれば、従来の方法において必要とされた複数回のPCRによる陽性クローンのスクリーニングなどの煩雑で時間のかかる操作が不要となり、cDNAライブラリーから簡便且つ迅速に所望のcDNAクローンを同定、取得することが可能である。

【0147】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>; Japan Tobacco, Inc.
<120>; Method for Preparing Gene Targeting DNA for Homologous Recombination And Method for Screening cDNA Library
<130>; J1-007DP1
<140>;
<141>;
<150>; JP11-071390
<151>; 1999-03-17
<160>; 25
<170>; PatentIn Ver. 2.1
<210>; 1
<211>; 20
<212>; DNA
<213>; Artificial Sequence

```

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
    synthesized primer sequence, "p3A"
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(20)
<;400>; 1
ctataggact gaaagacttg
20
<;210>; 2
<;211>; 20
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
    synthesized primer sequence, "p3B"
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(20)
<;400>; 2
tacttacaca gtagctcttc
20
<;210>; 3
<;211>; 43
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
    synthesized primer sequence, "pr2-1"
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(43)
<;400>; 3
acgcgttaat taacaaatct aggtcataac ctggttcac atc
43
<;210>; 4
<;211>; 44
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
    synthesized primer sequence, "pr2-2"
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(44)
<;400>; 4
acgcgtgcgg ccgcgtgttt attcctcatg gactgattat ggac
44
<;210>; 5
<;211>; 44
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially

```

```

        synthesized primer sequence, "pr3-1"
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(44)
<;400>; 5
acgcgtttaa ttaacttcac gacatctcga gcaagtcttt gagt 44
<;210>; 6
<;211>; 44
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
        synthesized primer sequence, "pr3-2"
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(44)
<;400>; 6
acgcgtgcgg ccgcgtgac ctgctggatt acattaaagc actg 44
<;210>; 7
<;211>; 20
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
        synthesized primer sequence, "EpoR11"
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(20)
<;400>; 7
gctccgaaca agttatgtac 20
<;210>; 8
<;211>; 21
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
        synthesized primer sequence, "EpoR21"
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(21)
<;400>; 8
tcgagctggt atgagaagct g 21
<;210>; 9
<;211>; 45
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
        synthesized primer sequence, "EpoR14"

```

```

<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1).. (45)

<;400>; 9
gtgttaatta agagagcaaa ggtaagaact gtacatgggc aatgc 45
<;210>; 10
<;211>; 44
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
        synthesized primer sequence, "EpoR24"
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1).. (44)
<;400>; 10
gcggcgcccg catgcagccc tagcttcagg aagctcaggg ctcc 44
<;210>; 11
<;211>; 21
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
        synthesized primer sequence, "neo24"
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1).. (21)
<;400>; 11
actgacacac attccacagc c 21
<;210>; 12
<;211>; 21
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
        synthesized primer sequence, "EpoR27"
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1).. (21)
<;400>; 12
ggtagtgccc taattccaac g 21
<;210>; 13
<;211>; 20
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
        synthesized primer sequence, "EpoR16"
<;220>;

```

```

<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(20)
<;400>; 13
gtgtctgaac tcgatgaggc 20
<;210>; 14
<;211>; 20
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
        synthesized primer sequence, "EpoR28"
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(20)
<;400>; 14
gcacagaagt tcttcggagc 20
<;210>; 15
<;211>; 1199
<;212>; DNA
<;213>; Mus musculus
<;220>;
<;221>; 5' UTR
<;222>; (1)..(155)
<;220>;
<;221>; CDS
<;222>; (156)..(1031)
<;220>;
<;221>; 3' UTR
<;222>; (1032)..(1199)
<;400>; 15
gcacaccggc cccggcgggc cccggcagag aagcccgcac aggtcccagg aaggtggcgt 60
cagcatctgc agccgcgtcg acgttgtctg agcctccgcg gaggaccag gagagtcgga 120
ctaggaccag ggccccgggc cteccccacgc tcct atg gaa aag cca gct gcc 173
        Met Glu Lys Pro Ala Ala
                1                5

tca aca gaa ccc caa ggg tct cgg ccc gcc ttg ggc cgt gaa agt gtc 221
Ser Thr Glu Pro Gln Gly Ser Arg Pro Ala Leu Gly Arg Glu Ser Val
                10                15                20

cag gtg ccc gat gac cag gac ttc cgc agt ttc cgg tca gag tgt gag 269
Gln Val Pro Asp Asp Gln Asp Phe Arg Ser Phe Arg Ser Glu Cys Glu
                25                30                35

gcc gag gtg ggc tgg aac ctg acc tac agc aag gcc ggc gtg tct gtg 317
Ala Glu Val Gly Trp Asn Leu Thr Tyr Ser Lys Ala Gly Val Ser Val
                40                45                50

tgg gtg cag gct gtg gag atg gat cga act ctg cac aag atc aag tgt 365
Trp Val Gln Ala Val Glu Met Asp Arg Thr Leu His Lys Ile Lys Cys
                55                60                65                70

cgg atg gaa tgc tgt gac gtg cca gct gag acg ctc tac gat gtc ctg 413
Arg Met Glu Cys Cys Asp Val Pro Ala Glu Thr Leu Tyr Asp Val Leu

```

| | | | | |
|--|-----|-----|-----|------|
| | 75 | 80 | 85 | |
| cat gac ata gaa tac aga aag aag tgg gac agt aat gtc att gag act | | | | 461 |
| His Asp Ile Glu Tyr Arg Lys Lys Trp Asp Ser Asn Val Ile Glu Thr | | | | |
| | 90 | 95 | 100 | |
| ttc gac atc gcc cgc ttg act gtc aac gct gac gta gga tat tat tcc | | | | 509 |
| Phe Asp Ile Ala Arg Leu Thr Val Asn Ala Asp Val Gly Tyr Tyr Ser | | | | |
| | 105 | 110 | 115 | |
| tgg agg tgt ccc aag ccc ctg aag aac cgt gat gtc atc acc ctc cgc | | | | 557 |
| Trp Arg Cys Pro Lys Pro Leu Lys Asn Arg Asp Val Ile Thr Leu Arg | | | | |
| | 120 | 125 | 130 | |
| tcc tgg ctc ccc atg ggc gct gat tac atc att atg aac tac tca gtg | | | | 605 |
| Ser Trp Leu Pro Met Gly Ala Asp Tyr Ile Ile Met Asn Tyr Ser Val | | | | |
| | 135 | 140 | 145 | 150 |
| aaa cac cct aaa tac cca cct cgg aaa gac ttg gtc cga gct gtg tcc | | | | 653 |
| Lys His Pro Lys Tyr Pro Pro Arg Lys Asp Leu Val Arg Ala Val Ser | | | | |
| | 155 | 160 | 165 | |
| atc cag acg ggc tac ctc atc cag agc acg ggg ccc aag agc tgc gtc | | | | 701 |
| Ile Gln Thr Gly Tyr Leu Ile Gln Ser Thr Gly Pro Lys Ser Cys Val | | | | |
| | 170 | 175 | 180 | |
| atc acc tac ctg gcc caa gtg gac ccc aaa ggc tcc tta ccc aag tgg | | | | 749 |
| Ile Thr Tyr Leu Ala Gln Val Asp Pro Lys Gly Ser Leu Pro Lys Trp | | | | |
| | 185 | 190 | 195 | |
| gtg gtg aat aag tca tct cag ttc ctg gcc ccc aag gcc atg aag aag | | | | 797 |
| Val Val Asn Lys Ser Ser Gln Phe Leu Ala Pro Lys Ala Met Lys Lys | | | | |
| | 200 | 205 | 210 | |
| atg tac aag gcc tgc atc aag tac ccc gag tgg aag cag aaa cac cag | | | | 845 |
| Met Tyr Lys Ala Cys Ile Lys Tyr Pro Glu Trp Lys Gln Lys His Gln | | | | |
| | 215 | 220 | 225 | 230 |
| cct cat ttc aag cca tgg ctg cac ccg gag cag agc cca ttg ccc agc | | | | 893 |
| Pro His Phe Lys Pro Trp Leu His Pro Glu Gln Ser Pro Leu Pro Ser | | | | |
| | 235 | 240 | 245 | |
| ctg gcg ctg tca gag ttg tcg gtg caa cat gca gac tca ctg gag aac | | | | 941 |
| Leu Ala Leu Ser Glu Leu Ser Val Gln His Ala Asp Ser Leu Glu Asn | | | | |
| | 250 | 255 | 260 | |
| atc gat gag agt gca gtg aca gag agc cgc gag gag cgg gca ggc ggt | | | | 989 |
| Ile Asp Glu Ser Ala Val Thr Glu Ser Arg Glu Glu Arg Ala Gly Gly | | | | |
| | 265 | 270 | 275 | |
| gcg gga gga gag ggc agc gac gat gac acc tcg ctc acc tga | | | | 1031 |
| Ala Gly Gly Glu Gly Ser Asp Asp Asp Thr Ser Leu Thr | | | | |
| | 280 | 285 | 290 | |
| gtgaccggct ctctgcaagg accaagacca gactgggggtg gaaccctggg gcaactgagcc | | | | 1091 |
| ttctctgcaact tcttcccttc cccacactgc ttctgggggg gcaactgggct cctgcccagg | | | | 1151 |
| tggctgcggc atggctggac atggccccaa taaatgaacc acacagcc | | | | 1199 |
| <;210>; 16 | | | | |
| <;211>; 291 | | | | |
| <;212>; PRT | | | | |
| <;213>; Mus musculus | | | | |
| <;400>; 16 | | | | |
| Met Glu Lys Pro Ala Ala Ser Thr Glu Pro Gln Gly Ser Arg Pro Ala | | | | |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Leu Gly Arg Glu Ser Val Gln Val Pro Asp Asp Gln Asp Phe Arg Ser | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| Phe Arg Ser Glu Cys Glu Ala Glu Val Gly Trp Asn Leu Thr Tyr Ser | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| Lys Ala Gly Val Ser Val Trp Val Gln Ala Val Glu Met Asp Arg Thr | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| Leu His Lys Ile Lys Cys Arg Met Glu Cys Cys Asp Val Pro Ala Glu | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Thr Leu Tyr Asp Val Leu His Asp Ile Glu Tyr Arg Lys Lys Trp Asp | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| Ser Asn Val Ile Glu Thr Phe Asp Ile Ala Arg Leu Thr Val Asn Ala | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| Asp Val Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Cys Pro Lys Pro Leu Lys Asn Arg | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Asp Val Ile Thr Leu Arg Ser Trp Leu Pro Met Gly Ala Asp Tyr Ile | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Ile Met Asn Tyr Ser Val Lys His Pro Lys Tyr Pro Pro Arg Lys Asp | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Leu Val Arg Ala Val Ser Ile Gln Thr Gly Tyr Leu Ile Gln Ser Thr | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Gly Pro Lys Ser Cys Val Ile Thr Tyr Leu Ala Gln Val Asp Pro Lys | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Gly Ser Leu Pro Lys Trp Val Val Asn Lys Ser Ser Gln Phe Leu Ala | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Pro Lys Ala Met Lys Lys Met Tyr Lys Ala Cys Ile Lys Tyr Pro Glu | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Trp Lys Gln Lys His Gln Pro His Phe Lys Pro Trp Leu His Pro Glu | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Gln Ser Pro Leu Pro Ser Leu Ala Leu Ser Glu Leu Ser Val Gln His | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Ala Asp Ser Leu Glu Asn Ile Asp Glu Ser Ala Val Thr Glu Ser Arg | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Glu Glu Arg Ala Gly Gly Ala Gly Gly Glu Gly Ser Asp Asp Asp Thr | | | |
| 275 | 280 | 285 | |

Ser Leu Thr

290

<;210>; 17

<;211>; 37

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence, "NY-C-F2"

<;220>;

<;221>; primer_bind

<;222>; (1)..(37)

<;400>; 17

agccgcgtcg acgttgctcg agcctccgcg gaggacc

<;210>; 18

37

```

<;211>; 30
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
        synthesized primer sequence, "NY-S-R4"
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1).. (30)
<;400>; 18
ccagcccccac tcggcctcac actctgaccg
<;210>; 19
<;211>; 43
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
        synthesized primer sequence, "NY-5'-PF3"
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1).. (43)
<;400>; 19
gctcgttaat taagccagct gcctcaacag aaccccaagg gtc
<;210>; 20
<;211>; 43
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
        synthesized primer sequence, "NY-5'-PR3"
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1).. (43)
<;400>; 20
caagcttaat taactcagac aacgtcgacg cggtgcaga tgc
<;210>; 21
<;211>; 842
<;212>; DNA
<;213>; Mus musculus
<;400>; 21
aatggcggtg aggtggcagg gcgcccgcg tgcccgtgt gcttccttcc cgcctcctgc 60
tcccctcact cggccctccc ccctcccgcg gcgagtgttt aaatccccc catcctggct 120
gcaggtcata ttccgatcca tgatgcctgc ctgtgcctc tgcttgcctg ccgtgcctcc 180
tactagggtt gctactgttc acccccatct cagccacagg caccgatgca gagaaccgcg 240
gcgagtgcgc ccagctcgaa ccaattacgg actgtgtgtt ggagtgcact ttggacaagg 300
actgtgcgga caaccgcaag tgctgccagg cgggctgcag ctctgtctgc tccaagccta 360
atggaccgag cgaaggagag ctctcaggga cagatactaa actctcagag actgggacta 420
ctactcaatc agcgggcctt gaccacacta ctaaaccacc gggaggtcaa gtctccacga 480
agccaccggt gtgaccaggg aaggcttagg tgtccgagaa aagcagggca cctgccccag 540
cgtggacata cccaagctcg gcctctgtga ggaccagtgt caggtggaca gccagtgttc 600

```

```

tggcaacatg aaatgctgcc gcaatggatg tgggaagatg gcctgcacca caccctaaatt 660
ctgagcttca gcctccagca gcctgaggaa tggagagagg ttgtttctgc cggactgtgc 720
atctggagtc gttcctgtgg cctcctttct ctctgggtctt tgcatcttctt cctgggtccga 780
tgaaagcatc tcctttttct aaccaataaa gtgatcgctt tcagcaatgg agaagctata 840
ac 842
<;210>; 22
<;211>; 32
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
        synthesized primer sequence, "HE4-F2"
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(32)
<;400>; 22
gggctgcagc tctgtctgct ccaagcctaa tg 32
<;210>; 23
<;211>; 30
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
        synthesized primer sequence, "HE4-R2"
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(30)
<;400>; 23
ctcagccaca ggaccgatgc agagaaaccc 30
<;210>; 24
<;211>; 705
<;212>; DNA
<;213>; Mus musculus
<;220>;
<;221>; 5' UTR
<;222>; (1)..(2)
<;220>;
<;221>; CDS
<;222>; (3)..(527)
<;220>;
<;221>; 3' UTR
<;222>; (528)..(705)
<;400>; 24
cc atg cct gcc tgt cgc ctc tgc ttg ctg gcc gct ggc ctc cta cta 47
    Met Pro Ala Cys Arg Leu Cys Leu Leu Ala Ala Gly Leu Leu Leu
        1             5             10             15
ggg ttg cta ctg ttc acc ccc atc tca gcc aca ggc acc gat gca gag 95
Gly Leu Leu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ala Thr Gly Thr Asp Ala Glu
        20             25             30
aaa ccc ggc gag tgc ccc cag ctc gaa cca att acg gac tgt gtg ttg 143

```

Lys Pro Gly Glu Cys Pro Gln Leu Glu Pro Ile Thr Asp Cys Val Leu
 35 40 45
 gag tgc act ttg gac aag gac tgt gcg gac aac cgc aag tgc tgc cag 191
 Glu Cys Thr Leu Asp Lys Asp Cys Ala Asp Asn Arg Lys Cys Cys Gln
 50 55 60
 gcg ggc tgc agc tct gtc tgc tcc aag cct aat gga ccg agc gaa gga 239
 Ala Gly Cys Ser Ser Val Cys Ser Lys Pro Asn Gly Pro Ser Glu Gly
 65 70 75
 gag ctc tca ggg aca gat act aaa ctc tca gag act ggg act act act 287
 Glu Leu Ser Gly Thr Asp Thr Lys Leu Ser Glu Thr Gly Thr Thr Thr
 80 85 90 95
 caa tca gcg ggc ctt gac cac act act aaa cca ccg gga ggt caa gtc 335
 Gln Ser Ala Gly Leu Asp His Thr Thr Lys Pro Pro Gly Gly Gln Val
 100 105 110
 tcc acg aag cca ccg gct gtg acc agg gaa ggc tta ggt gtc cga gaa 383
 Ser Thr Lys Pro Pro Ala Val Thr Arg Glu Gly Leu Gly Val Arg Glu
 115 120 125
 aag cag ggc acc tgc ccc agc gtg gac ata ccc aag ctc ggc ctc tgt 431
 Lys Gln Gly Thr Cys Pro Ser Val Asp Ile Pro Lys Leu Gly Leu Cys
 130 135 140
 gag gac cag tgt cag gtg gac agc cag tgt tct ggc aac atg aaa tgc 479
 Glu Asp Gln Cys Gln Val Asp Ser Gln Cys Ser Gly Asn Met Lys Cys
 145 150 155
 tgc cgc aat gga tgt ggg aag atg gcc tgc acc aca ccc aaa ttc tga 527
 Cys Arg Asn Gly Cys Gly Lys Met Ala Cys Thr Thr Pro Lys Phe
 160 165 170 175
 gcttcagcct ccagcagcct gaggaacgga gagaggttgt ttctgccgga ctgtgcatct 587
 ggagtcgttc ctgtggcctc cttctctctt ggtctttgca tttcttcttg gtccgacgaa 647
 agcatctcct ttttctaacc aataaagtga tcgttttcag caatggagaa gctataac 705
 <;210>; 25
 <;211>; 174
 <;212>; PRT
 <;213>; Mus musculus
 <;400>; 25
 Met Pro Ala Cys Arg Leu Cys Leu Leu Ala Ala Gly Leu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ala Thr Gly Thr Asp Ala Glu Lys
 20 25 30
 Pro Gly Glu Cys Pro Gln Leu Glu Pro Ile Thr Asp Cys Val Leu Glu
 35 40 45
 Cys Thr Leu Asp Lys Asp Cys Ala Asp Asn Arg Lys Cys Cys Gln Ala
 50 55 60
 Gly Cys Ser Ser Val Cys Ser Lys Pro Asn Gly Pro Ser Glu Gly Glu
 65 70 75 80
 Leu Ser Gly Thr Asp Thr Lys Leu Ser Glu Thr Gly Thr Thr Thr Gln
 85 90 95
 Ser Ala Gly Leu Asp His Thr Thr Lys Pro Pro Gly Gly Gln Val Ser
 100 105 110
 Thr Lys Pro Pro Ala Val Thr Arg Glu Gly Leu Gly Val Arg Glu Lys
 115 120 125

| |
|---|
| Gln Gly Thr Cys Pro Ser Val Asp Ile Pro Lys Leu Gly Leu Cys Glu |
| 130 135 140 |
| Asp Gln Cys Gln Val Asp Ser Gln Cys Ser Gly Asn Met Lys Cys Cys |
| 145 150 155 160 |
| Arg Asn Gly Cys Gly Lys Met Ala Cys Thr Thr Pro Lys Phe |
| 165 170 |

【0148】「配列表フリーテキスト」

配列番号：1

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列p3A。

配列番号：2

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列p3B。

配列番号：3

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列pr2-1。

配列番号：4

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列pr2-1。

配列番号：5

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列pr3-1。

配列番号：6

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列pr3-2。

配列番号：7

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列EpoR11。

配列番号：8

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列EpoR21。

配列番号：9

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列EpoR14。

配列番号：10

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列EpoR24。

配列番号：11

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列neo24。

配列番号：12

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列EpoR27。

配列番号：13

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列EpoR16。

配列番号：14

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列EpoR28。

配列番号：17

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列NY-C-F2。

配列番号：18

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列NY-S-R4。

配列番号：19

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列NY-5'-PF3。

配列番号：20

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列NY-5'-PR3。

配列番号：22

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列HE4-F2。

配列番号：23

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列HE4-R2。

【0149】

【図面の簡単な説明】

【図1】（1）マウスHPRTをコードするゲノム遺伝子の制限酵素地図、並びに（2）マウスHPRT遺伝子のエクソン2またはエクソン3の塩基配列を基に設計したプライマーを用いて種々の環状化マウスゲノムDNAを鋳型として逆PCRを行うことにより増幅されるDNAのゲル電気泳動像を各々示す図。分図1(a)は、マウスHPRTをコードするゲノム遺伝子の制限酵素地図、並びに該制限酵素により切断して得られるゲノムDNA断片のおおよその大きさを模式的に示す。分図1(b)は、マウスHPRT遺伝子を含むマウスゲノムDNAを保持するBAC DNAをEcoRI、HindIIIまたはBamHIで切断して得られるゲノムDNA断片を環状化した環状ゲノムDNAを鋳型とし、マウスHPRT遺伝子のエクソン2の塩基配列を基に設計した一対のプライマーを用いた逆PCRにより増幅されるDNAのゲル電気泳動像を示す。分図1(c)、マウスHPRT遺伝子を含むマウスゲノムDNAを保持するBAC DNAをEcoRI、HindIIIまたはBamHIで切断して得られるゲノムDNA断片を環状化した環状ゲノムDNAを鋳型とし、マウスHPRT遺伝子のエクソン3の塩基配列を基に設計した一対のプライマーを用いた逆PCRにより増幅されるDNAのゲル電気泳動像を示す。

【図2】プラスミドp1108及びp1207の各々の制限酵素地図を示す図。

【図3】（1）マウスの内在性ゲノムDNAとターゲティングDNAとの間の正常な相同組換えの結果、マウスHPRT遺伝子のエクソン3中に該ターゲティングDNAが組み込

まれた組換えES細胞の内在性ゲノムDNAの制限酵素地図、並びに(2)該組換えES細胞のゲノムDNAを種々の制限酵素で切断して得られるゲノムDNA断片に対する、ターゲティングDNA中の一部の塩基配列を基に設計されたプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションにおけるオートラジオグラフを各々示す図。分図3(a)は、マウスの内在性ゲノムDNAとターゲティングDNAとの間の正常な相同組換えの結果、マウスHPRT遺伝子のエクソン3中に該ターゲティングDNAが組み込まれた組換えES細胞の内在性ゲノムDNAの制限酵素地図、並びに該制限酵素により切断して得られるゲノムDNA断片のおおよその大きさを模式的に示す。分図3(b)は、組換えES細胞1207-1のゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーションでのオートラジオグラフを示す。分図3(c)は、組換えES細胞1207-2のゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーションでのオートラジオグラフを示す。

【図4】マウスEPO受容体遺伝子を含むマウスゲノムDNAを保持するBAC DNAをXhoIで切断して得られるゲノムDNA断片を環状化した環状ゲノムDNAを鋳型とし、マウスEPO受容体遺伝子のエクソン1の塩基配列を基に設計した一対のプライマーを用いた逆PCRにより増幅されるDNAのゲル電気泳動像を示す図。右レーンには、マウスEPO受容体遺伝子を含むマウスゲノムDNAを保持するBAC DNAをXhoIで切断して得られるゲノムDNA断片を環状化した環状ゲノムDNAを鋳型とした場合のPCRにより得られたPCR産物を制限酵素XhoIで再切断して得られたDNAの結果を示す。矢印で示した部分に期待される大きさのDNAの増幅を示すバンドが認められる。真中のレーンは、マウスEPO受容体遺伝子を含むマウスゲノムDNAを保持するBAC DNAをXhoIで切断して得られるゲノムDNA断片を環状化した環状ゲノムDNAを鋳型とした場合の結果を示す。矢印で示した部分に期待される大きさのDNAの増幅を示すバンドが認められる。左レーンは、λファージDNAを制限酵素HindIIIで切断して得たサイズマーカーの電気泳動の状態を示す。

【図5】プラスミドpEpoR K/Iの調製方法を模式的に示す図。

【図6】プラスミドp1108-Lucの制限酵素地図を示す図。

【図7】マウスの内在性ゲノムDNAとターゲティングDNAとの間の正常な相同組換えの結果、マウスEPO受容体遺伝子のエクソン1中に該ターゲティングDNAが組み込まれた組換えES細胞のPCRによるスクリーニングの手法を模式的に示す図。

【図8】(1)マウスの内在性ゲノムDNAとターゲティングDNAとの間の正常な相同組換えの結果、マウスEPO受容体遺伝子のエクソン1中に該ターゲティングDNAが組み込まれた組換えES細胞の内在性ゲノムDNAの制限酵素地図、並びに(2)該組換えES細胞のゲノムDNAを種々の制限酵素で切断して得られるゲノムDNA断片に対す

る、ターゲティングDNA中の一部の塩基配列を基に設計されたプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションにおけるオートラジオグラフを各々示す図。分図8(a)は、マウスの内在性ゲノムDNAとターゲティングDNAとの間の正常な相同組換えの結果、マウスEPO受容体遺伝子のエクソン1中に該ターゲティングDNAが組み込まれた組換えES細胞の内在性ゲノムDNAの制限酵素地図、並びに該制限酵素により切断して得られるゲノムDNA断片のおおよその大きさを模式的に示す。分図8(b)は、組換えES細胞(No. 20)及び野生型マウスES細胞の各々のゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーションでのオートラジオグラフを示す。

【図9】前述した「課題を解決するための手段」の段落番号34に記載した本発明の(1)乃至(12)の構成を例示的に示す図。

【図10】前述した「課題を解決するための手段」の段落番号34に記載した本発明の(13)乃至(24)の構成を例示的に示す図。

【図11】前述した「課題を解決するための手段」の段落番号34に記載した本発明の(25)乃至(36)の構成を例示的に示す図。

【図12】前述した「課題を解決するための手段」の段落番号34に記載した本発明の(56)の構成を例示的に示す図。

【図13】前述した「課題を解決するための手段」の段落番号34に記載した本発明の(57)の構成を例示的に示す図。

【図14】前述した「課題を解決するための手段」の段落番号34に記載した本発明の(58)の構成を例示的に示す図。

【図15】前述した「課題を解決するための手段」の段落番号34に記載した本発明の(37)乃至(50)の構成を例示的に示す図。

【図16】前述した「課題を解決するための手段」の段落番号34に記載した本発明の(75)乃至(81)の構成を例示的に示す図。

【図17】マウスGN遺伝子を含むプラスミドクローンの同定、選別マウスゲノムDNAライブラリーである各々のウェルにセットされた各々の環状DNA(プラスミドマウスゲノムDNA)を鋳型として、マウスGN遺伝子の塩基配列に相補的な一対のプライマーNY-C-F2及びNY-S-R4を用いたPCR反応(通常の内向きのPCR)により増幅されるDNAのゲル電気泳動像を示す図。図面の下段は、クローンの名称を示す。マーカーの大きさは、最上部から、10、8.0、6.0、4.0、3.0、2.0、1.75、1.5、及び1.0(Kb)を示す。

【図18】マウスGN遺伝子を含むマウスゲノムDNAを保持する環状プラスミドDNAの各々を鋳型として、マウスGN遺伝子の塩基配列に相補的な一対のプライマーNY-5'-P F3及びNY-5'-PR3を用いた逆PCR反応により増幅して得ら

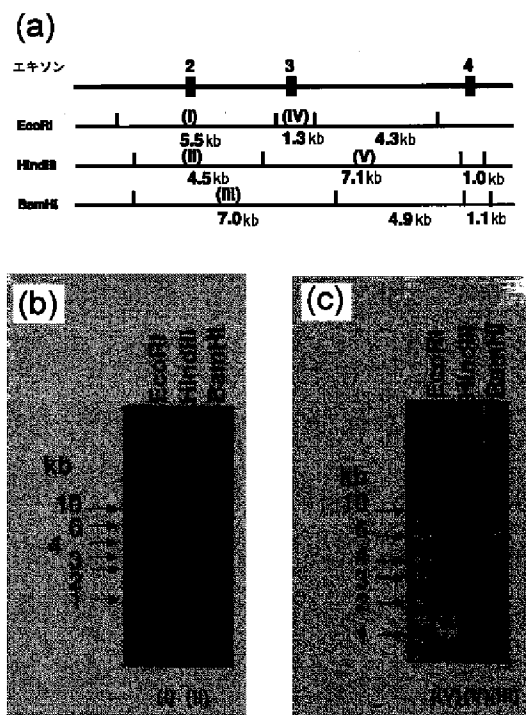
れるPCR産物を大腸菌内でさらに増幅して得たプラスミドDNAを制限酵素（KpnI、SalI、XhoI、PvuI）で消化して生成されるDNA断片の電気泳動像を示す図。図面の下段は、クローンの名称を示す。マーカーの大きさは、最上部から、10、8.0、6.0、4.0、3.0、2.0、1.75、1.5、及び1.0（Kb）を示す。

【図19】制限酵素PacIで切断したマウスGN遺伝子を含むマウスゲノムDNAを保持するプラスミドDNAをルシフェラーゼ遺伝子及びネオマイシン耐性遺伝子を有するDNAカセットと連結して再環状化したDNAを大腸菌JM109内でさらに増幅して得られるプラスミドDNAを制限酵素（Spe

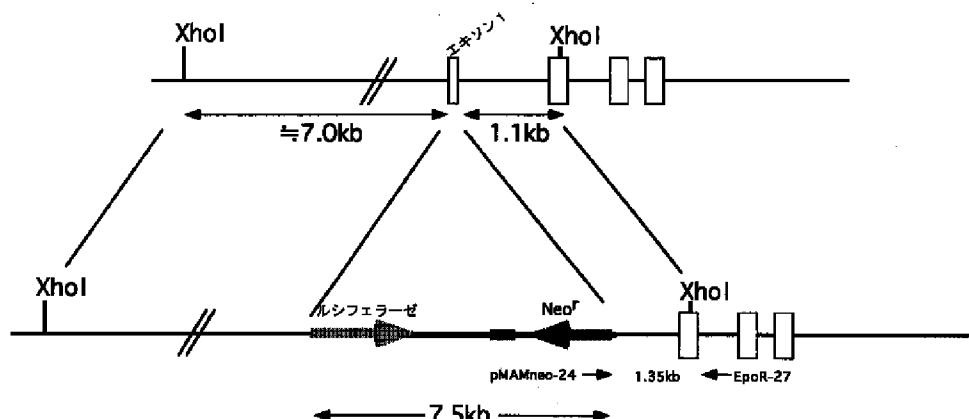
I、EcoRI、MluI）またはRNaseで消化して生成されるDNA断片の電気泳動像を示す図。図面の下段は、クローンの名称を示す。マーカーの大きさは、最上部から、10、8.0、6.0、4.0、3.0、2.0、1.75、1.5、及び1.0（Kb）を示す。

【図20】マウス腎臓cDNAライブラリーの各々のウェルにセットされたcDNAクローンを鋳型として、マウスESTの塩基配列に相補的な一対のプライマーHE4-F2及びHE4-R2を用いた逆PCR反応により増幅されるDNAのゲル電気泳動像を示す図。

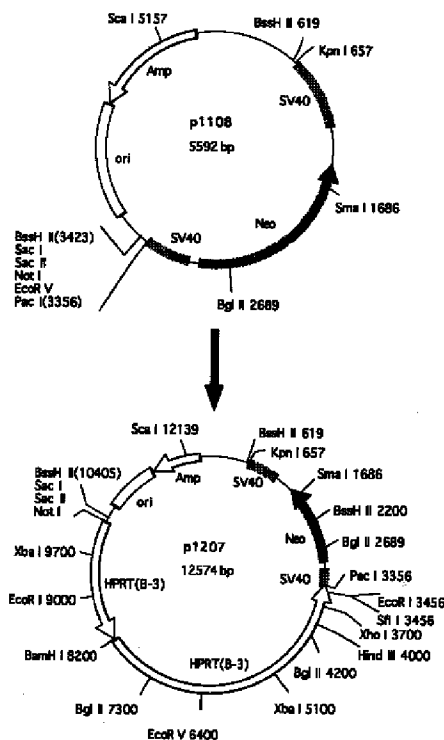
【図1】



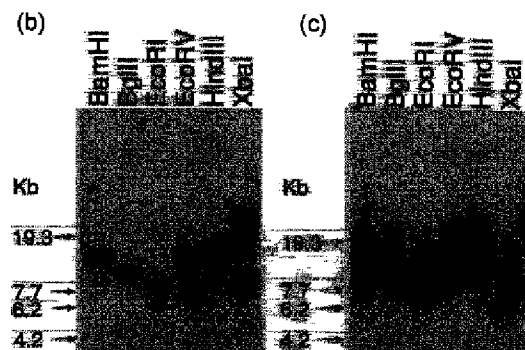
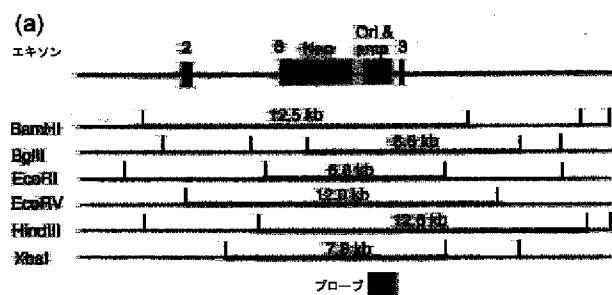
【図7】



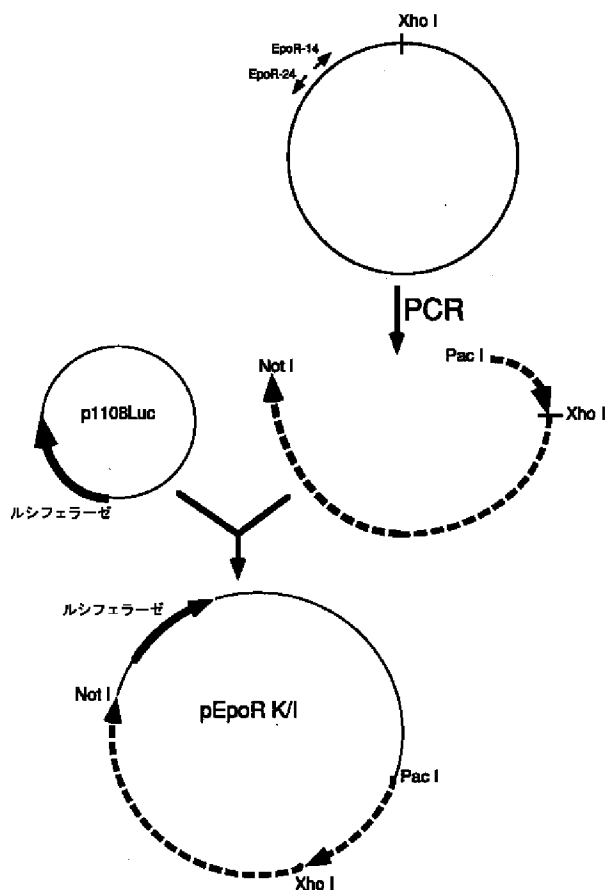
【図2】



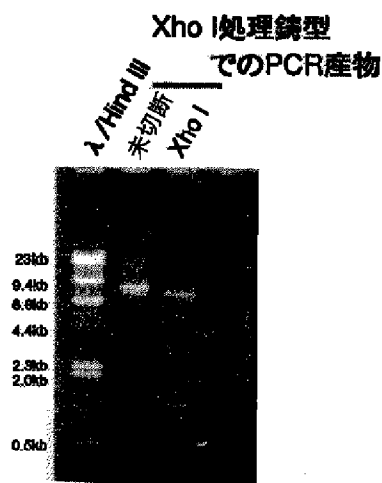
【図3】



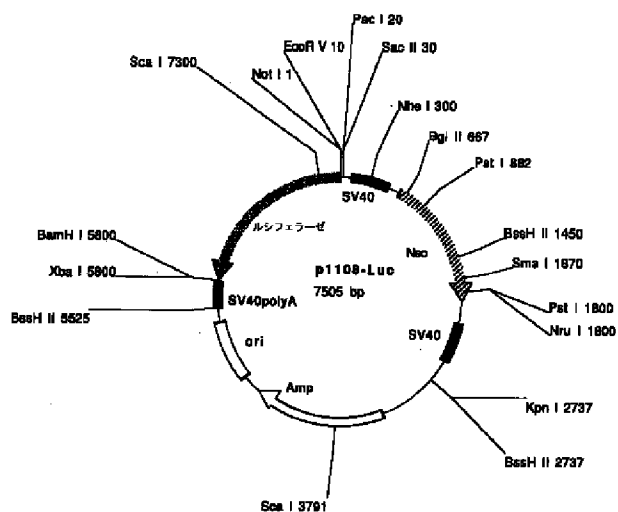
【図5】



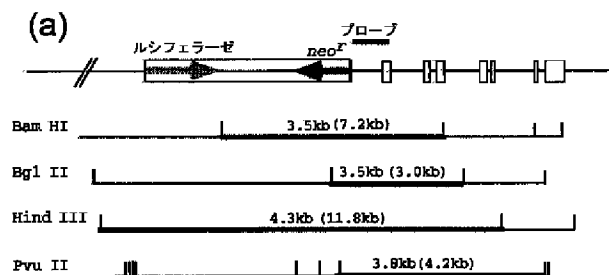
【図4】



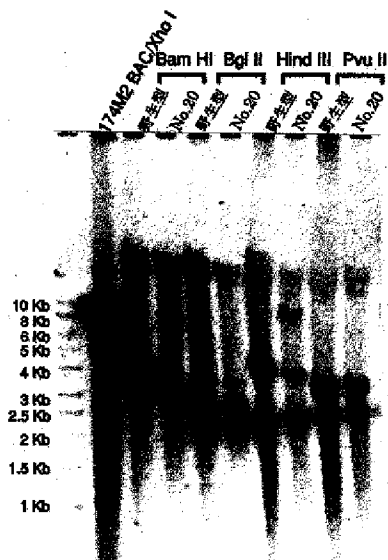
【図6】



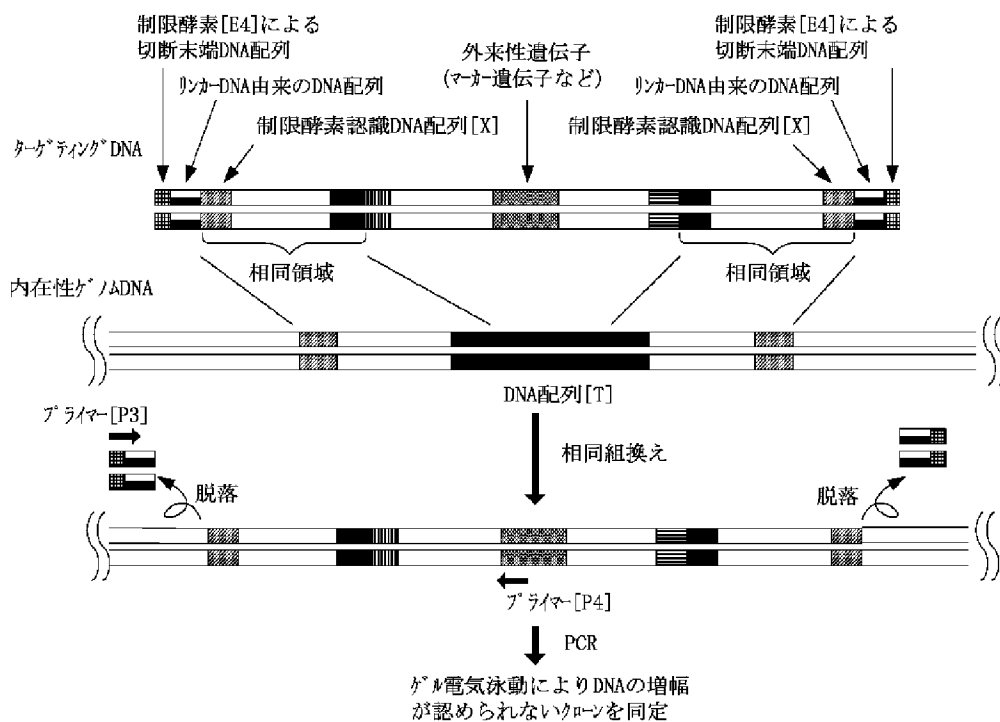
【図 8】



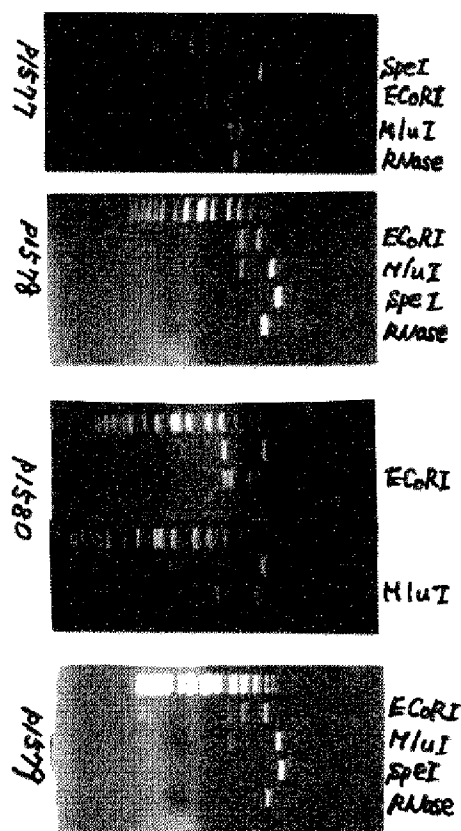
(b)



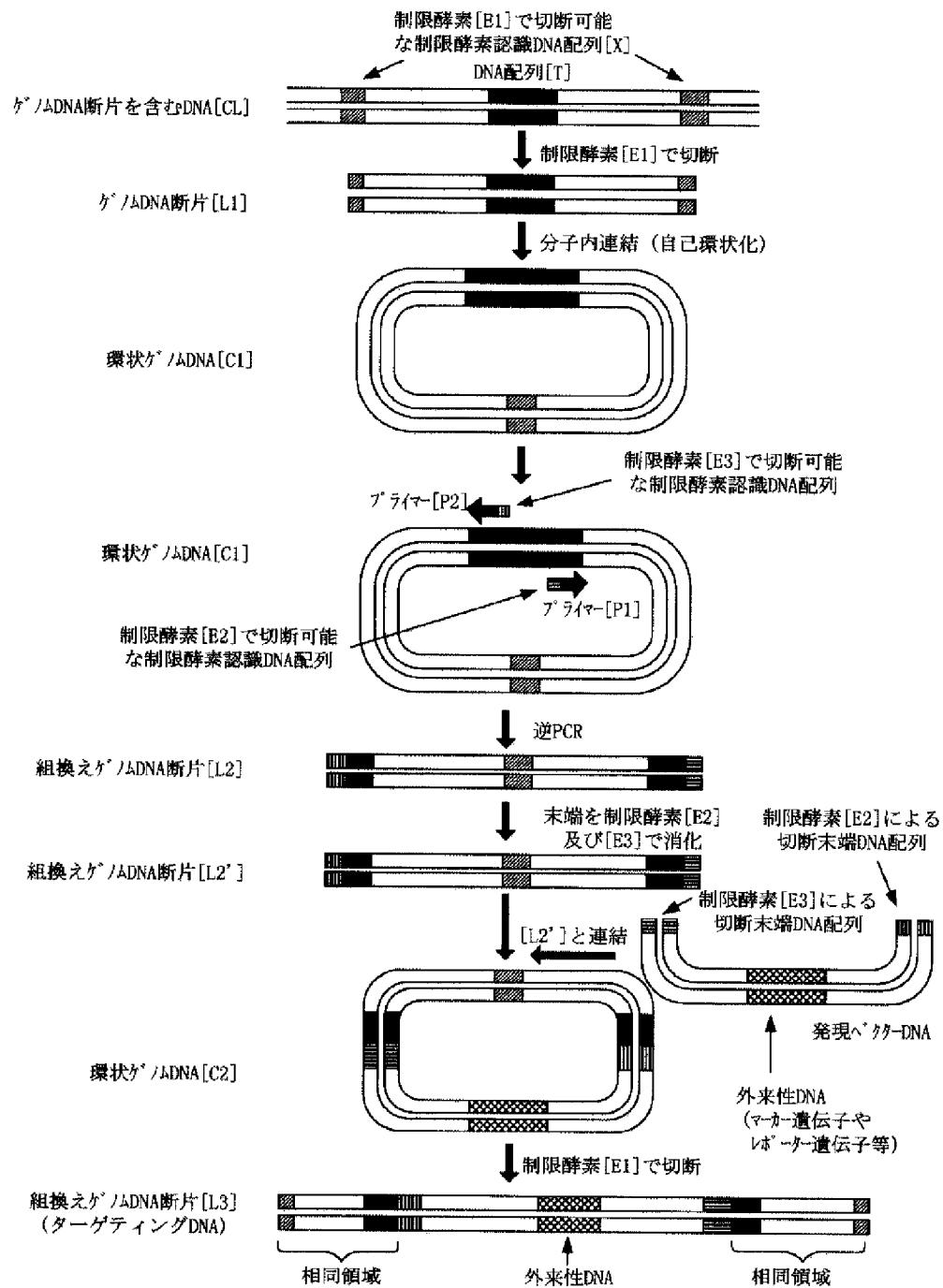
【図 12】



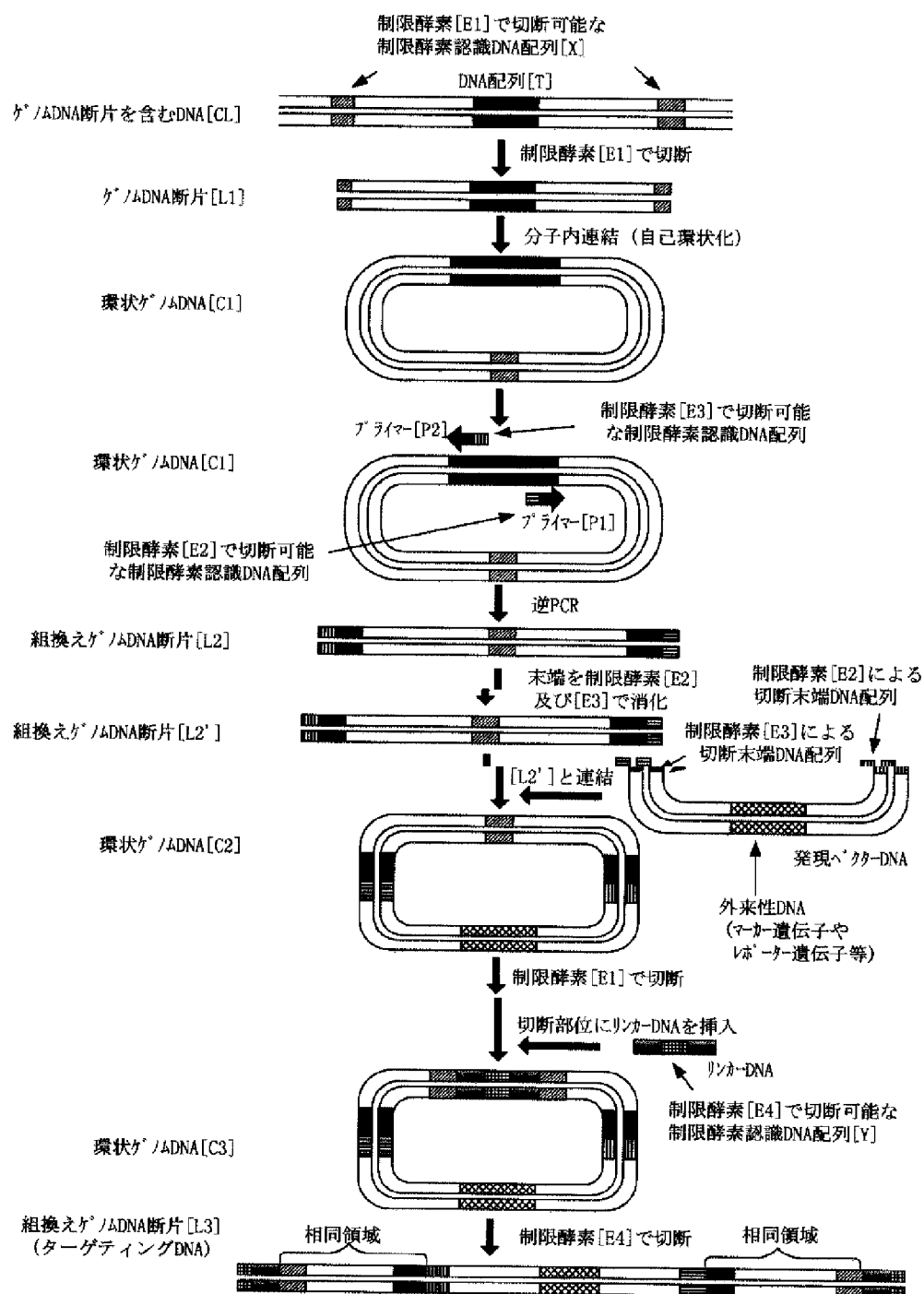
【図 19】



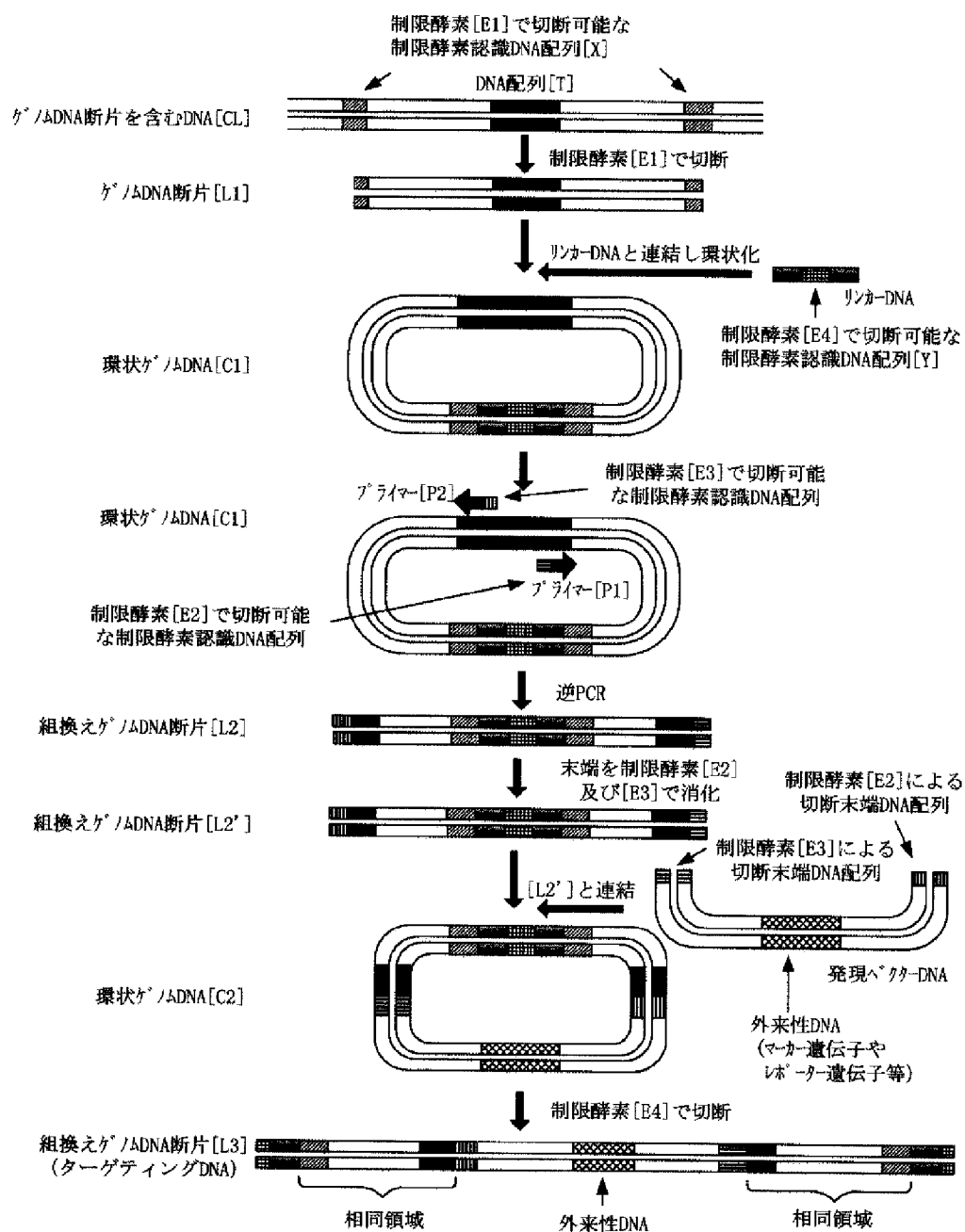
【図9】



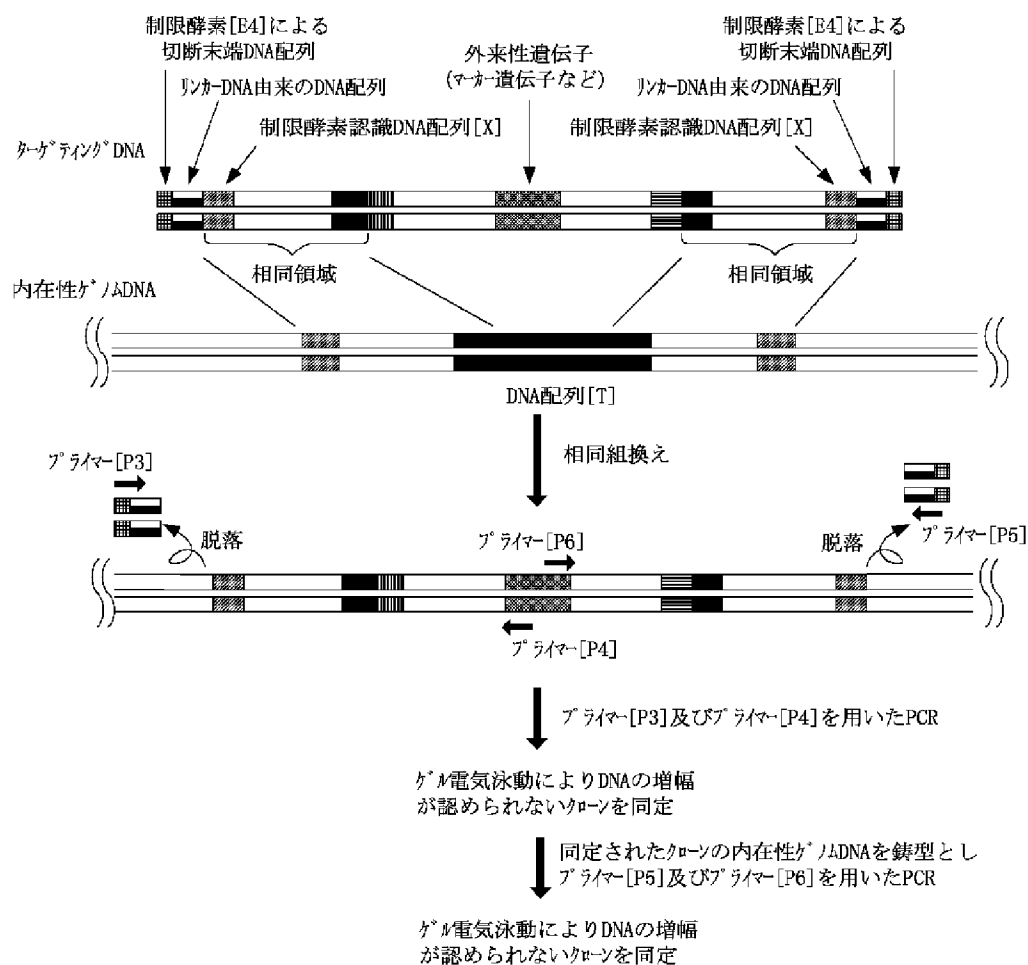
【図10】



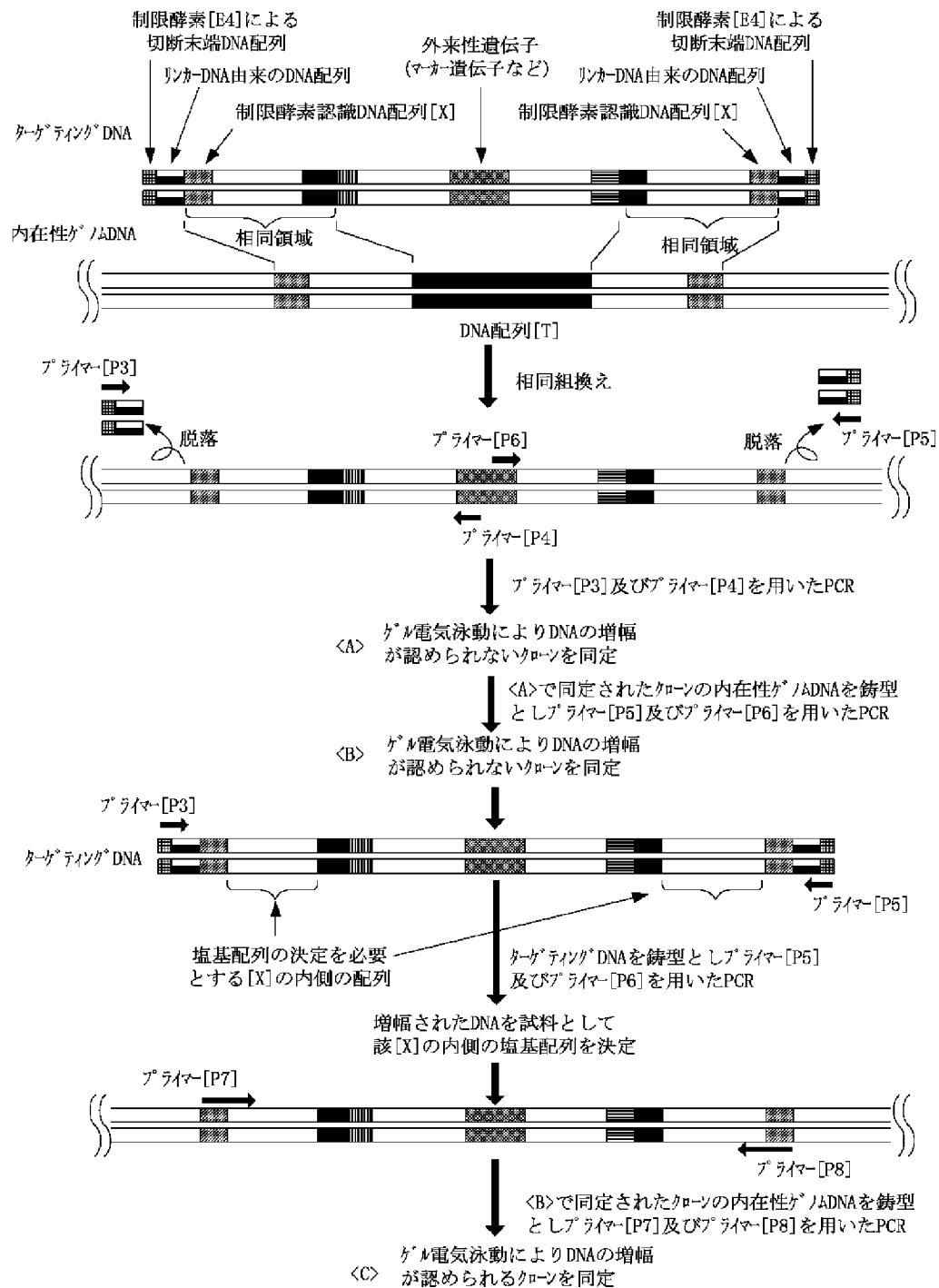
【図11】



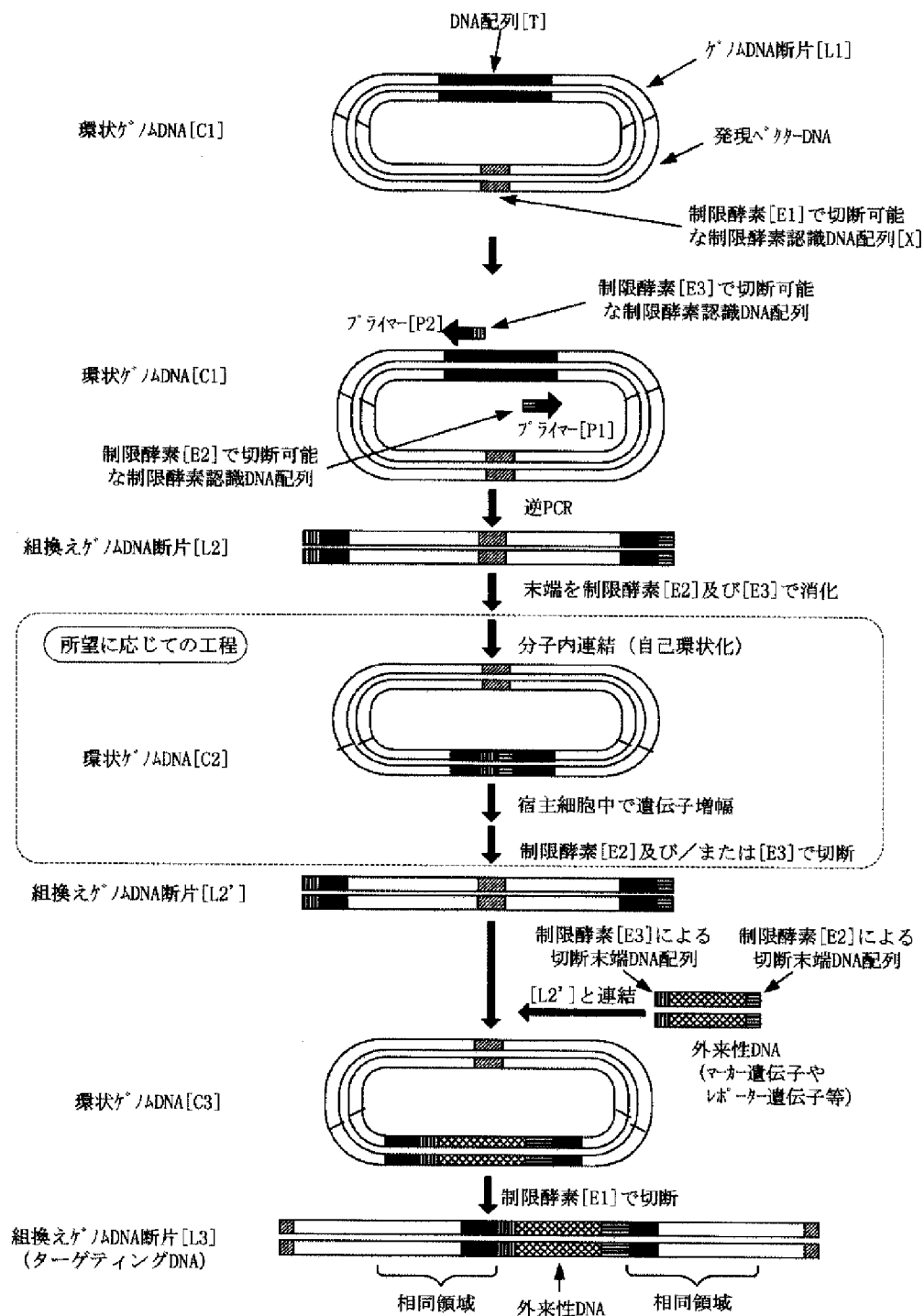
【図 1 3】



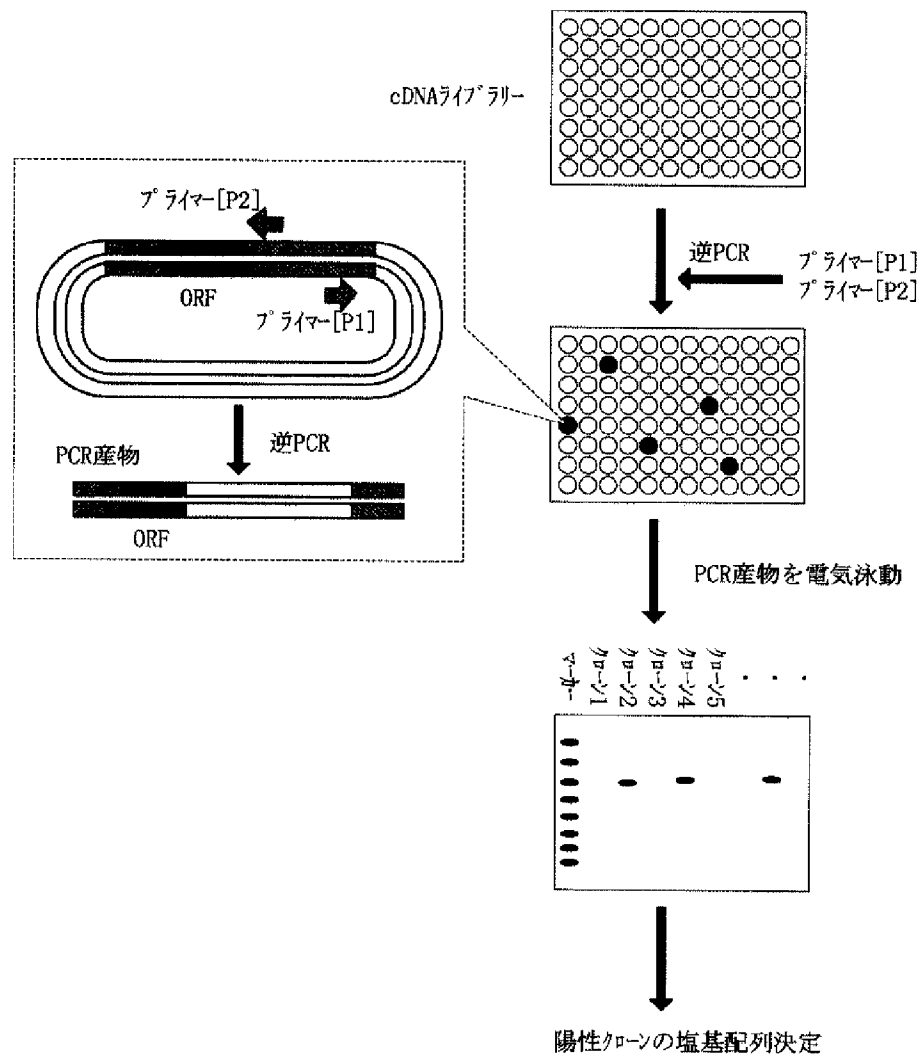
【図 1 4】



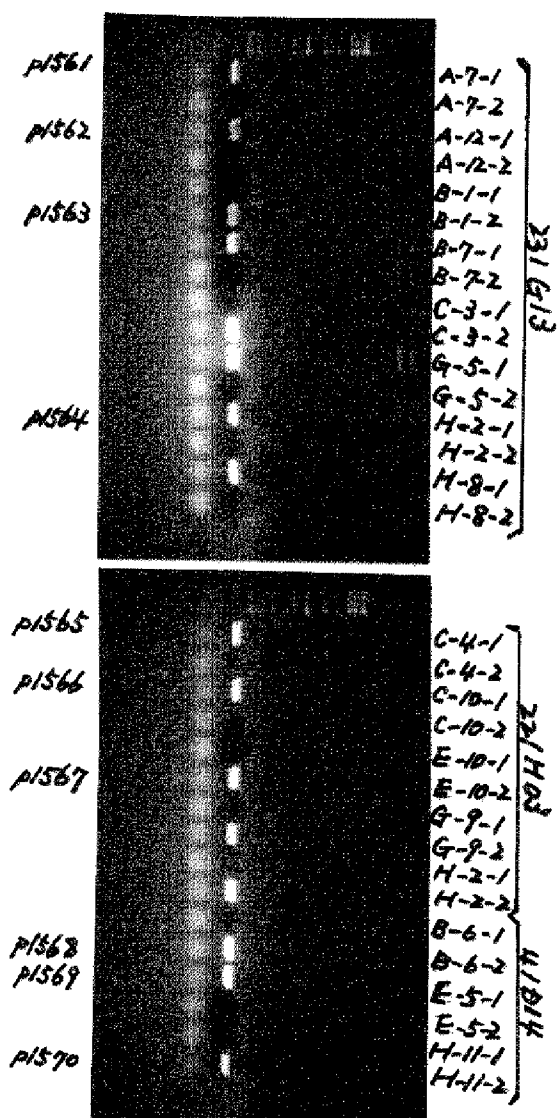
【図15】



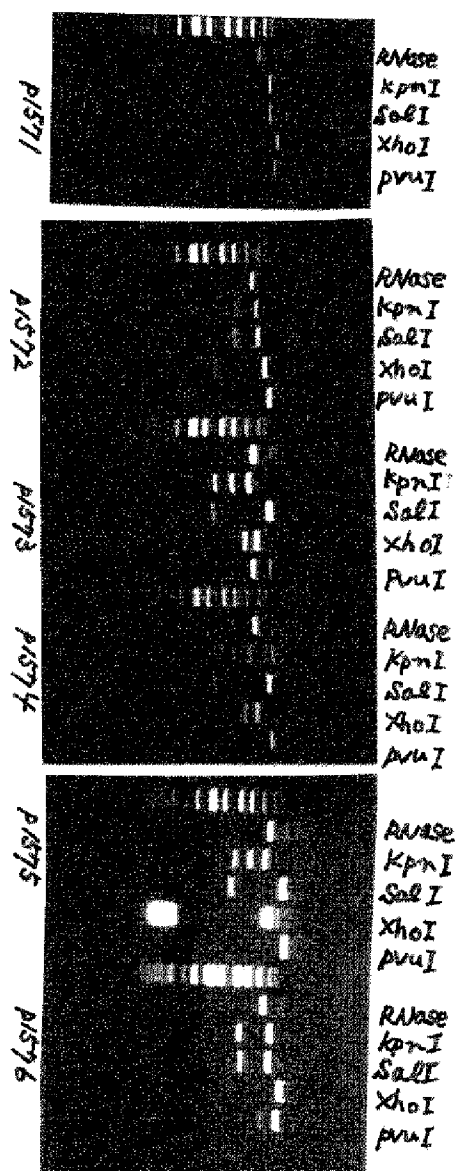
【図 16】



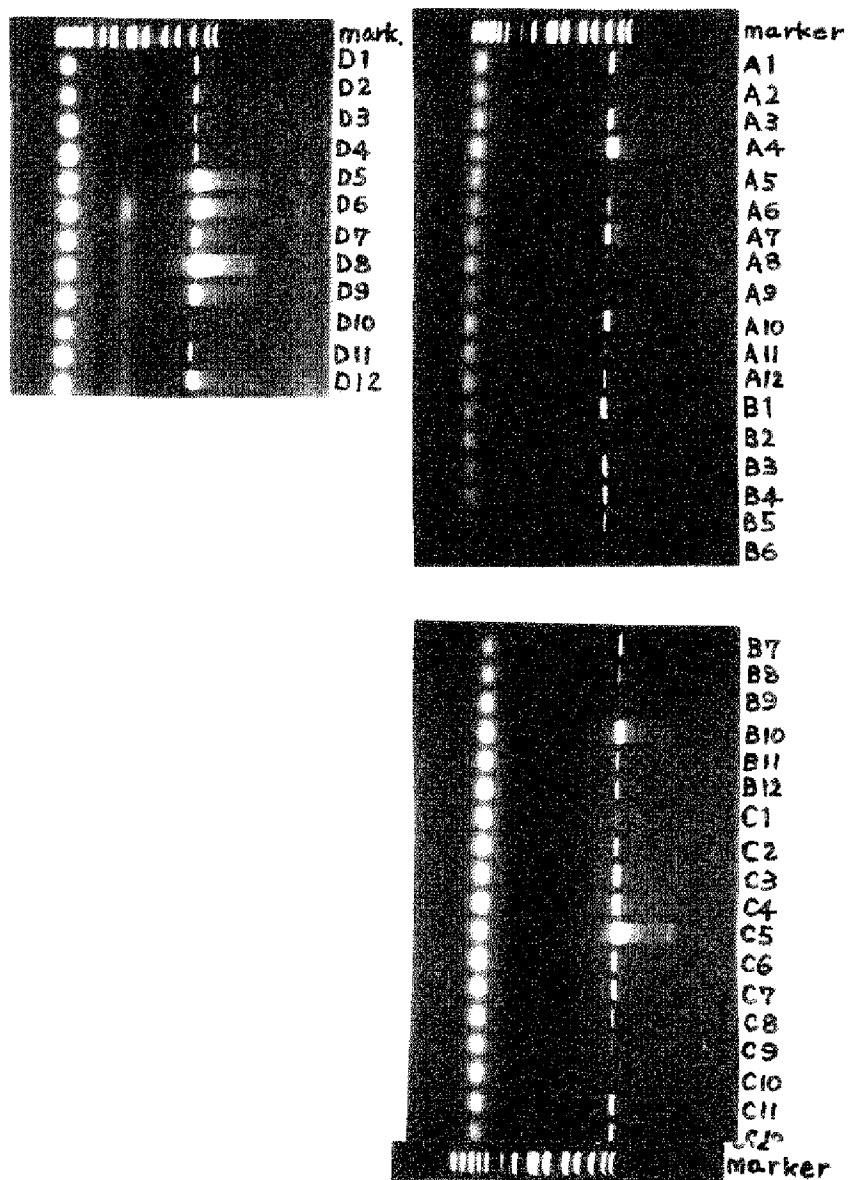
【図17】



【図18】



【図20】



【手続補正書】

【提出日】平成12年3月31日（2000. 3. 31）

【手続補正2】

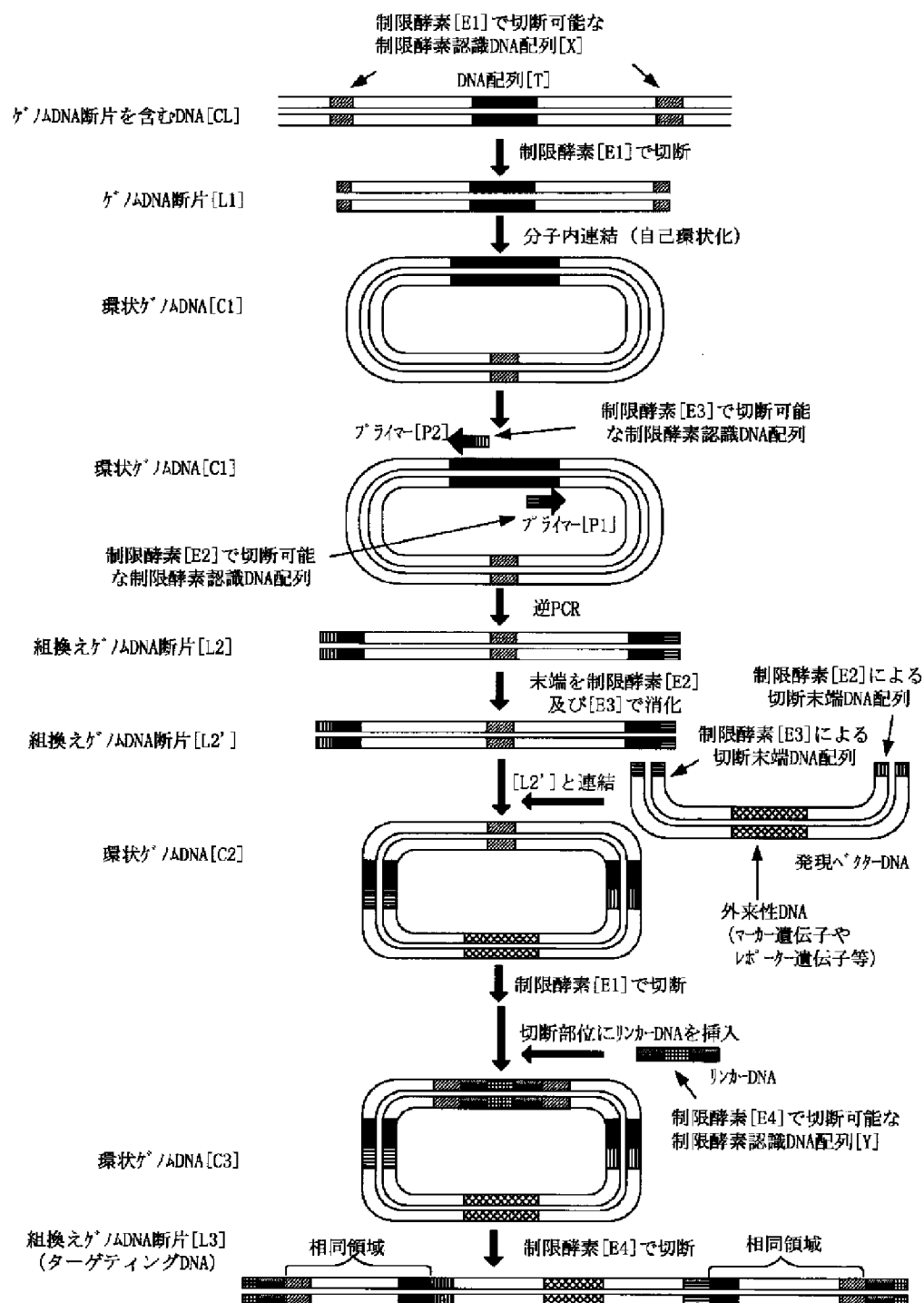
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図10

【補正方法】変更

【補正内容】

【図10】



フロントページの続き

| (51) Int. Cl. ⁷ | | 識別記号 | F I | テーマコード (参考) |
|----------------------------|------|------|--------------|-------------|
| C 1 2 N | 1/21 | | C 1 2 N 1/21 | |
| | 5/10 | | C 1 2 Q 1/68 | A |
| C 1 2 Q | 1/68 | | C 1 2 N 5/00 | A |